



\

**Università di Pisa**

**Scuola di Dottorato in**  
***Neuroscienze e Scienze Endocrinometaboliche***

**PROGRAMMA DOTTORALE IN**  
***MORFOLOGIA E FUNZIONE NORMALE E PATOLOGICA***  
***DI CELLULE E TESSUTI***  
**(settore scientifico-disciplinare: BIO/16)**

**MANIFESTAZIONI PARALLELE FRA**  
**SISTEMA NERVOSO CENTRALE ED ENTERICO**  
**NELLA MALATTIA DI PARKINSON**

**Presidente**  
**Chiar.mo Prof. Amelio Dolfi**

**Candidata**  
**Dott.ssa Antuela Matarangasi**

**Relatore**  
**Chiar.mo Prof. Gianfranco Natale**

**Ciclo 2009/2011**

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>4</b>
------------------	----------

<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
-----------------	----------

## **PARTE GENERALE**

<b>CAPITOLO 1 - LA MALATTIA DI PARKINSON</b>	<b>7</b>
--	----------

1.1. Storia	7
1.2. Clinica ed epidemiologia	9
1.3. Patogenesi	11
1.4. Alterazioni a livello centrale	14
1.5. Alterazioni periferiche neurovegetative	15

<b>CAPITOLO 2 - MALATTIA DI PARKINSON E ALTERAZIONI DIGESTIVE</b>	<b>21</b>
---	-----------

2.1. Disturbi della salivazione (drooling)	23
2.2. Alterazioni dentali	24
2.3. Disfagia	24
2.4. Alterazioni gastriche	26
2.5. Alterazioni dell'intestino tenue	27
2.6. Alterazioni del colon	27
2.7. Disfunzione anorettale	29
2.8. Perdita di peso	29

<b>CAPITOLO 3 - PARALLELISMO FRA LESIONI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE ED ENTERICO NELLA MALATTIA DI PARKINSON</b>	<b>30</b>
---	-----------

<b>CAPITOLO 4 - STRATEGIE TERAPEUTICHE NEL TRATTAMENTO DEI SINTOMI DIGESTIVI NELLA MALATTIA DI PARKINSON</b>	<b>36</b>
--	-----------

<b>CAPITOLO 5 - MODELLI SPERIMENTALI DI MALATTIA DI PARKINSON</b>	<b>39</b>
 <b>PARTE SPERIMENTALE</b>	
<b>CAPITOLO 6 – INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>42</b>
<b>CAPITOLO 7 - MATERIALI E METODI</b>	<b>46</b>
7.1. <i>Animali</i>	46
7.2. <i>Trattamento con MPTP</i>	46
7.3. <i>Test comportamentali</i>	46
7.4. <i>Indagini morfologiche</i>	46
7.4.1. <i>Microscopia ottica</i>	47
7.4.1.1. <i>Colorazione con Ematossilina e Eosina</i>	48
7.4.1.2. <i>Immunoistochimica</i>	48
7.4.2. <i>Microscopia elettronica</i>	49
7.4.2.1. <i>Immunocitochimica</i>	49
7.4.3. <i>Immunoblotting</i>	50
<b>CAPITOLO 8 - RISULTATI</b>	<b>51</b>
<b>CAPITOLO 9 – DISCUSSIONE</b>	<b>55</b>
<b>CAPITOLO 10 – CONCLUSIONI</b>	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>60</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>74</b>

## RIASSUNTO

La Malattia di Parkinson (MdP) è una patologia neurodegenerativa che interessa i neuroni dopaminergici della *substantia nigra* determinando nei pazienti disturbi motori. Alterazioni non motorie interessano diversi organi, in particolare il tratto gastrointestinale. Nel presente studio abbiamo riprodotto sperimentalmente la MdP con la neurotossina 1-metil, 4-fenil, 1,2,3,6,-tetraidropiridina (MPTP). In topi C57BL di nove settimane sono stati valutati gli effetti indotti dal trattamento con MPTP, nella *substantia nigra*, nello striato e nel duodeno. Su questi animali sono stati condotti test motori (*Open field* e *PaGE test*). Una settimana dopo il trattamento con MPTP (5 mg/kg x2/dì, per 3 settimane) il duodeno è stato prelevato ed esaminato con tecniche di istologia, immunoistochimica e *immunoblotting* per la tirosina idrossilasi (TH) e per l' $\alpha$ -sinucleina. Esperimenti di immunocitochimica sono stati condotti al microscopio elettronico. I test motori hanno mostrato deficit nel *PaGE test* in tutti gli animali trattati con MPTP, mentre non sono state trovate differenze tra trattati e controlli sottoposti all'*open field test*. L'analisi delle sezioni istologiche ha mostrato alcune alterazioni quali una lieve atrofia della mucosa duodenale e alterazioni al livello ghiandolare. Al microscopio elettronico l'orletto a spazzola è apparso discontinuo. In tutti i topi trattati con MPTP risultava ridotta l'immunopositività alla TH sia nella *substantia nigra* che nello striato, confermando l'effetto neurotossico centrale sui neuroni dopaminergici. A livello del duodeno è risultata ridotta l'immunopositività alla TH. Questo è stato confermato con la tecnica semiquantitativa di *immunoblotting*. Inoltre, indagini immunologiche hanno evidenziato un aumento dell' $\alpha$ -sinucleina promosso dal trattamento con MPTP, sia a livello centrale che a livello periferico. L'immunopositività all' $\alpha$ -sinucleina è stata evidenziata, inoltre, mediante indagini in microscopia elettronica. Il presente studio mostra che il trattamento con MPTP induce alterazioni a livello del duodeno in maniera analoga a quanto avviene nel sistema dopaminergico nella *substantia nigra* e nello striato. Inoltre, questo modello sperimentale di MdP riproduce le alterazioni gastrointestinali osservate nei pazienti parkinsoniani. Questi risultati danno sostanza al concetto che il sistema nervoso enterico agisca come un "secondo cervello".

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative condition which affects dopaminergic neurons of the *substantia nigra* (SN), leading to a movement disorder. Non motor alterations occur in several viscera, in particular the gastrointestinal tract. In 9-week old C57BL mice we examined the effects of the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl, 4-phenyl, 1,2,3,6,-tetrahydropyridine (MPTP, administered chronically) in SN and striatum, as well as in duodenum. Motor tests (open field and PaGE) were performed. One week after treatment with MPTP (5 mg/kg x2/die, for 3 weeks), histological investigations, immunohistochemistry and immunoblotting for tyrosine hydroxylase (TH), and  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) were carried out. Immunocytochemical investigations were analyzed under electron microscopy. Motor tests showed a failure of the PaGE test in all MPTP-treated animals, whereas no difference was found in open field test in comparison with controls. Analysis of histological sections showed some alterations consisting of slight atrophy of duodenal mucosa and glandular disarrangement. Under electron microscopy the brush border appeared discontinuous. In all MPTP-administered mice, TH immunopositivity was reduced in SN and striatum, confirming its central dopaminergic neurotoxicity. At duodenal level, TH immunostaining was lost following MPTP treatment. This was confirmed by semiquantitative immunoblotting. Moreover,  $\alpha$ -syn immunostaining was enhanced by MPTP treatment. Following MPTP treatment  $\alpha$ -syn immunopositive structures were investigated under electron microscopy. Our study shows that administration of MPTP induces alterations at duodenal level reminiscent of dopaminergic damage in SN and striatum. Moreover, this experimental model of parkinsonism features gastrointestinal dysfunction observed in PD patients. These findings lend substance to the concept of the enteric nervous system as a double brain which recapitulates and is an ancestry of the central nervous system.

# **PARTE GENERALE**

# 1. LA MALATTIA DI PARKINSON

## 1.1. STORIA

La malattia di Parkinson (MdP) è una malattia neurodegenerativa progressiva che colpisce l'1% della popolazione, comunemente tra i 50 e i 60 anni (Rajput, 1992; De Rijk *et al.*, 2000). Rappresenta la seconda malattia neurodegenerativa più diffusa nel mondo, dopo la malattia di Alzheimer, più frequente tra le popolazioni occidentali e con una lieve prevalenza nel sesso maschile (Baldereschi *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2003).

Le prime descrizioni di sintomi simili alla MdP sono state ritrovate in scritture indiane e in antiche fonti cinesi risalenti al 1000 a.C., (Zhang *et al.*, 2006) tuttavia, è solo dai primi anni del XIX secolo che tradizionalmente si fa risalire l'inquadramento nosologico della malattia. I sintomi della malattia furono descritti per la prima volta dal neurologo inglese James Parkinson, che nel 1817 parlò di "paralisi agitante". Infatti, i principali sintomi di questa malattia sono di tipo motorio e consistono in tremore a riposo, rigidità, ipo- e bradicinesia e anomalie posturali (Parkinson, 1817). Successivamente Jean-Martin Charcot, un medico francese, tra il 1868 e il 1881 dette un notevole contributo alla comprensione della malattia distinguendo tra rigidità, debolezza e bradicinesia e identificando forme atipiche della malattia, aggiungendo alla descrizione originale di Parkinson altri sintomi, come la rigidità muscolare, l'ipomimia e le alterazioni sensoriali. Fu proprio nel 1887 che Charcot denominò la malattia con il nome di Malattia di Parkinson in onore di James Parkinson (Charcot, 1872). William Gowers, nel 1880, ha descritto le deformità articolari tipiche di questa patologia, affermando che "*i movimenti delle dita a livello dell'articolazione metacarpo-falangea sembrano simile ai movimenti degli orientali che battono i loro piccoli tamburi*" (Gower, 1888).

Altre descrizioni cliniche sono date da Richer e Meige (1895) che hanno lasciato disegni e statue raffiguranti pazienti affetti da MdP e che rimangono tra i documenti iconografici più importanti riguardo questa patologia. Nel 1912 Lewy descrisse inclusioni citoplasmatiche, denominate successivamente corpi di Lewy (LB, *Lewy bodies*), come formazioni debolmente eosinofile all'interno dei nuclei della base di

pazienti parkinsoniani (Lewy, 1912). Oggi sappiamo che i LB consistono in aggregati eterogenei di lipidi e proteine che si ritrovano nel citoplasma dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SNpc) che sono stati risparmiati dai processi neurodegenerativi, nei neuroni della corteccia cerebrale e nei nuclei colinergici del proencefalo basale (Braak *et al.*, 1995).

Successivamente, nel 1919 Trètiakoff e von Economo descrissero in reperti autoptici di pazienti morti di encefalite letargica che manifestavano sintomi parkinsoniani, gravi danni a carico della SNpc.

Nel 1925 Brissaud per la prima volta identificò nella SNpc la sede anatomica della MdP e negli anni '20, Trètiakoff e altri autori dettero un grande contributo alla comprensione della MdP con vari studi sul mesencefalo (Trètiakoff, 1921; Brissaud, 1925; Foix e Nicolesco, 1925).

Ehrninger e Hornykiewicz nel 1960 (Bjorklund e Dunnett, 2007; Hornykiewicz, 2006) hanno osservato una perdita di neuroni dopaminergici al livello dello striato nei pazienti con la MdP; questa scoperta, per la quale fu conferito ai due ricercatori il premio Nobel per la medicina nell'anno 2000, ha aperto la strada al primo trial di somministrazione con la Levodopa nei pazienti parkinsoniani (Birkmayer e Hornykiewicz, 1961). Nel 1961 è stato dimostrato che le iniezioni di levodopa miglioravano l'acinesia nei pazienti con malattia di Parkinson. Di conseguenza nel decennio successivo ed è stata introdotta la somministrazione di levodopa per via orale (Birkmayer e Hornykiewicz, 1998). Più recentemente è stato evidenziato che le mutazioni genetiche, il *folding* scorretto delle proteine, l'aumento dello stress ossidativo, le disfunzioni mitocondriali, le infiammazioni e gli altri meccanismi patogenetici possono giocare un ruolo importante nella morte delle cellule dopaminergiche e non-dopaminergiche nel cervello dei pazienti con MdP (McNaught *et al.*, 2007).



## **1.2. CLINICA ED EPIDEMIOLOGIA**

I principali sintomi di questa malattia sono di tipo motorio e consistono in tremore a riposo, rigidità, ipo- e bradicinesia e anomalie posturali.

Nella storia clinica della MdP si individuano 2 fasi:

1. La fase presintomatica
2. La fase sintomatica

La fase più tardiva della malattia, quella sintomatica, corrisponde all'evoluzione progressiva dei sintomi motori, ed è la fase più semplice da identificare: viene distinta in cinque stadi. Questo sistema è utilizzato per distinguere la patologia unilaterale (stadio I), la patologia bilaterale (stadio II-V) e anche lo sviluppo dell'insufficienza posturale (stadio III) come una chiave d'accesso alla sintomatologia della patologia (Hoehn e Yahr, 1967). Al contrario, la prima fase è un concetto più recente grazie al contributo degli studi PET, che si basa sul deficit di captazione striatale di fluoro in soggetti asintomatici. Stimando la durata media di questa fase in circa dieci anni, durante i quali si verificherebbe l'accelerazione del processo fisiologico di degenerazione dei neuroni dopaminergici compresi anche i disturbi gastrointestinali (Kaufmann *et al.*, 2004).

Clinicamente la MdP è caratterizzata da quattro sintomi motori come il tremore a riposo, la rigidità, l'acinesia o bradicinesia, e l'instabilità posturale, questi segni cardinali vengono conosciuti come *TRAP* (*Tremor at rest, Rigidity, Acinesia o Bradycinesia, Postural instability*). Inoltre, postura flessa e il congelamento (blocco motore "*freezing*") sono stati inclusi tra le caratteristiche classiche della forma comune della MdP (Jankovic, 2007).

*Il tremore.* È uno fra i tre segni cardinali della patologia. Il movimento classico è quello di "contare le monete" causato dai movimenti di flessione-estensione o adduzione-abduzione delle dita. Il tremore ha una frequenza da 4-6 Hz e si propaga dalle parti distali a quelle prossimali. Può essere presente anche nel volto, e riguardare in particolare le labbra e la lingua. Anche nelle fasi avanzate di malattia, raramente è interessato il capo/collo o la voce. È un tremore a riposo che scompare durante i movimenti volontari ed è assente durante il sonno.

In uno studio di Hughes *et al* nel 1993 è stato dimostrato che il 69% di pazienti con MdP ha avuto tremore all'esordio della malattia, il 75% ha avuto tremore durante la malattia, invece per il 9% il tremore è scomparso negli stadi più avanzati della malattia.

*La rigidità.* Contribuisce alla lentezza e alla riduzione di ampiezza dei movimenti caratteristici della MdP. Può costituire per molti anni il solo segno della comparsa della malattia. Nelle fasi iniziali è limitata a pochi gruppi muscolari, ma poi si diffonde in altri distretti. La rigidità può apparire prossimale (ad esempio, collo, spalle, fianchi) e distale (ad esempio, polsi, caviglie).

*L'acinesia o bradicinesia.* La bradicinesia è uno dei primi sintomi della comparsa della MdP ed è un segno distintivo dei disturbi dei gangli della base. Si caratterizza per la difficoltà nel pianificare, iniziare e compiere dei movimenti sequenziali e simultanei (Berardelli *et al.*, 2001), finché si arriva all'arresto totale e al "congelamento motorio" (*freezing*). Altre manifestazioni della bradicinesia comprendono la perdita di movimenti spontanei, come la gesticolazione e il *drooling* a causa della compromissione dei muscoli della deglutizione (Bagheri *et al.*, 1999) e la perdita dell'espressione facciale (ipomimia).

Tra i sintomi non motori, si può osservare stipsi, disturbi vescicali, ipoosmia "vertigini" ortostatiche, dolori, crampi e parestesie, deflessione del tono dell'umore, ipotensione ortostatica, declino cognitivo, disturbi gastrointestinali e tutti sintomi che anticipano le alterazioni motorie (Wolters, 2009; Valters *et al.*, 2005). Altri sintomi comprendono i disturbi del sonno REM, la paralisi dello sguardo verticale, riduzione dell'olfatto, affaticabilità, deterioramento dentale e perdita del peso (Jankovic, 2007)

### ***1.3. PATOGENESI***

Dal punto di vista patologico, la MdP si caratterizza per la progressiva e selettiva degenerazione dei neuroni nigrostriatali e in particolare delle cellule dopaminergiche della SNpc. Molti studi hanno dimostrato che alla base delle manifestazioni cliniche della MdP vi è una riduzione dei livelli di dopamina nello striato come conseguenza della neurodegenerazione dei terminali nervosi nigrostriatali (Albin *et al.*, 1989; Crossman, 1989; DeLong, 1990; Greenamyre, 1993).

Nella MdP la morte progressiva dei neuroni dopaminergici della SNpc riduce drasticamente l'attività dopaminergica nello striato e, quindi, il suo effetto facilitatorio sul movimento. Infatti, la riduzione dell'attività della via diretta e indiretta produce un'iperattività del globo pallido interno (GPi) e, quindi, un'eccessiva inibizione delle proiezioni talamo-corticali. La drastica riduzione dell'attività dei gangli della base è all'origine delle manifestazioni cliniche motorie della MdP (Bezard *et al.*, 2001).

Altra importante caratteristica patologica della MdP è la presenza dei LB, inclusioni di forma rotonda, eosinofile, che si ritrovano nel soma delle cellule e nei neuriti di certe popolazioni neuronali, in particolare le cellule dopaminergiche della SNpc (Goedert, 2001) e che contengono aggregati di molte proteine tra cui immunopositività per l'ubiquitina (Lewy, 1912; Jellinger, 1987). I LB sono presenti nei neuroni dopaminergici della SNpc risparmiati dai processi neurodegenerativi e nei neuroni della corteccia cerebrale (Braak *et al.*, 1995). Il costituente principale dei LB è una proteina chiamata  $\alpha$ -sinucleina (Spillantini *et al.*, 1997). Diversi studi sottolineano che la presenza a livello del terminale presinaptico dell' $\alpha$ -sinucleina sia coinvolta nella formazione di tali inclusioni e nella patogenesi della malattia (Spillantini *et al.*, 1997, 1998; Di Monte, 2003). Inoltre, mutazioni puntiformi nel gene per l' $\alpha$ -sinucleina sono state collegate al Parkinson familiare, suggerendo un ruolo cruciale dell' $\alpha$ -sinucleina nell'insorgenza della MdP. La forma normale dell' $\alpha$ -sinucleina è monomerica, ma ad alte concentrazioni può polimerizzare in filamenti che poi partecipano alla formazione di inclusioni citoplasmatiche note come LB (Dawson *et al.*, 2002; Giasson e Lee, 2003; Goedert, 2001).

Dal punto di vista biochimico, una disfunzione mitocondriale, dovuta all'inibizione del complesso I e allo stress ossidativo correlato con tale inibizione, sono implicati nella

patogenesi di questa malattia (Betarbet *et al.*, 2003; Greenamyre *et al.*, 2003). Lo stress ossidativo è dovuto a un aumento della produzione di radicali liberi altamente reattivi che producono danno ossidativo al DNA, lipidi e proteine. Inoltre, nelle cellule dopaminergiche, lo stress ossidativo causato dal metabolismo della dopamina e dalla sua autossidazione potrebbe aumentare selettivamente la loro vulnerabilità nei confronti di tossine mitocondriali come l'1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP). (McNaught e Jenner, 2001).

Ad oggi non si conosce la vera causa di morte dei neuroni dopaminergici e la terapia ha solo lo scopo di alleviare i sintomi. Tuttavia, sembra che non sia un unico fattore a determinare la malattia ma che la concomitanza di più fattori sia alla base dello sviluppo della MdP, tra cui fattori ambientali e genetici.

Ad esempio, mutazioni del gene dell' $\alpha$ -sinucleina nel cromosoma 4 sono state associate al Parkinson familiare (Polymeropoulos *et al.*, 1997), così come mutazioni nei geni della parkina, del DJ-1 e dell'ubiquitina idrolasi carbossi-terminale L1 (UCH-L1) (Polymeropoulos *et al.*, 1997). In particolare, mutazioni per la parkina sono state messe in relazione con una forma di parkinsonismo giovanile autosomico recessivo (AR-JP), mentre mutazioni nel gene UCH-L sono state descritte in due membri di una famiglia tedesca con Parkinson autosomico dominante (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Greene *et al.*, 2003).

Si pensa che anche i fattori ambientali possano avere un ruolo importante nella MdP (Calne e Langston, 1983), anche se la maggior parte dei pazienti non è in grado di identificare nel loro passato un'esposizione a una tossina ambientale sufficiente da far manifestare la malattia. Questo sottolinea ancora di più come tale malattia sia multifattoriale, "*multiple hit hypothesis*", legata cioè alla concomitanza o ripetitiva presenza di fattori che cooperano alla maggiore suscettibilità alla morte cellulare (Di Monte, 2003; Greenamyre *et al.*, 2003).

Altre sostanze ritenute causa di MdP sono i pesticidi. Tra gli insetticidi quello che ha suscitato maggior interesse è il rotenone. Questo è un insetticida naturale che interagisce in modo specifico con il complesso I della catena respiratoria mitocondriale (Schuler e Casida, 2001). Il rotenone riesce a passare molto rapidamente la membrana cellulare e la barriera ematoencefalica per poi accumularsi nei mitocondri (Talpade *et al.*, 2000;

Drolet *et al.*, 2009). Tra le sostanze tossiche si ritrova anche il piombo (Jones e Miller, 2008) e il manganese (Guilarte *et al.*, 2006).

La MdP è stata strettamente associata allo stress ossidativo e alla disfunzione mitocondriale (Greenamyre *et al.*, 2003; Sherer *et al.*, 2001). Lo stress ossidativo è una condizione cellulare che deriva da: (a) aumentata produzione di radicali liberi altamente reattivi, (b) diminuita eliminazione di queste specie reattive, (c) aumentata ossidazione di proteine, lipidi, DNA, (d) diminuita *clearance* di prodotti ossidati che possono essere tossici per le cellule. I radicali liberi si possono generare in vari processi cellulari come la respirazione ossidativa mitocondriale e il metabolismo della dopamina (DA). Lungo la catena mitocondriale del trasporto degli elettroni (ETC) ci sono diversi siti in cui si ha “perdita di elettroni” tra cui, parlando sempre in ambito della MdP, assume una grande importanza quello situato nel complesso I dell’ETC, prossimale al sito di legame per gli inibitori (es. rotenone). La parziale inibizione di tale complesso potrebbe determinare un aumento della produzione di radicali liberi e dello stress ossidativo senza effetti significativi sulla respirazione mitocondriale. Infatti, l’inibizione del complesso I, quando causata dall’esposizione al rotenone *in vivo* nei ratti (Sherer *et al.*, 2003) e *in vitro* (Sherer *et al.*, 2002) in cellule di neuroblastoma, ha portato a un aumento dei livelli di carbonilici proteici, che sono marker dello stress ossidativo. È stato osservato inoltre che, nella SNpc di pazienti parkinsoniani, è presente un aumento della perossidazione lipidica e un danno ossidativo al DNA e alle proteine (Dexter *et al.*, 1989; Jenner, 1998), oltre a ridotti livelli di glutatione, uno scavenger dei radicali liberi, questa è una prova ulteriore della presenza di stress ossidativo nella MdP (Sian *et al.*, 1994).

I neuroni dopaminergici sono particolarmente sensibili all’aumento dello stress ossidativo dovuto alla produzione di radicali liberi indotta dall’autossidazione e dal metabolismo della DA (Lotharius e Brundin, 2002; Perez e Hastings, 2004). La DA tende ad autossidarsi in specie dopamino-chinoniche, radicali superossido e perossido di idrogeno, tutte molecole altamente reattive o che possono velocemente generare radicali liberi. Altri danni ossidativi come quelli dati dalle tossine mitocondriali ambientali possono rendere i neuroni dopaminergici molto vulnerabili.

Lo stress ossidativo può influenzare più o meno direttamente il sistema ubiquitina-proteasoma (UP). I componenti del proteasoma possono essere direttamente ossidati,

mentre l'aumento della produzione di proteine ossidate può alterare la funzionalità del sistema UP, generando l'accumulo tossico di proteine danneggiate nella cellula. La dopamina è anche in grado di indurre, nelle cellule PC12, l'inibizione del sistema UP che dipende, in parte, dalla produzione di radicali liberi (Keller *et al.*, 2000).

#### **1.4. ALTERAZIONI A LIVELLO CENTRALE**

Negli ultimi anni lo studio della MdP è progredito notevolmente e grossi passi avanti sono stati fatti nella comprensione dei sintomi clinici e della progressione della malattia.

Inizialmente la MdP era considerata solo un disturbo del movimento causata dalla perdita dei neuroni dopaminergici nella SNpc. Oggi la MdP viene riconosciuta come una malattia neurodegenerativa molto complessa caratterizzata da sintomi motori e non motori. Inoltre, è stato dimostrato che la SNpc non è l'unica area del SNC compromessa nella MdP. In uno studio di Braak *et al.* (2003) sono stati descritti in maniera dettagliata gli stadi patologici della progressione della MdP. In particolare, è stata osservata la comparsa di aggregati contenenti  $\alpha$ -sinucleina nei neuroni del tronco encefalico, al livello dei nuclei dorsali del nervo vago e dei bulbi olfattivi. Queste inclusioni positive per l' $\alpha$ -sinucleina si estendono in modo graduale a tutto il tronco encefalico (Braak *et al.*, 2003), coinvolgendo la SNpc soltanto nel terzo stadio della malattia. Saito *et al.* nel 2003 hanno confermato che le  $\alpha$ -sinucleinopatie iniziano nel midollo allungato.

Recenti studi hanno dimostrato che il processo neurodegenerativo nella MdP è molto ampio e non coinvolge soltanto il SNC ma anche i circuiti neuronali del sistema autonomo periferico (Djaldetti *et al.*, 2009).

La MdP è una patologia del sistema extrapiramidale. Diverse regioni dell'encefalo contribuiscono a controllare i movimenti: la corteccia motoria e non-motoria e anche aree più profonde del cervello, conosciute come i gangli della base che sono un gruppo di nuclei, fra cui il *globus pallidus*, il nucleo caudato, il nucleo subtalamico, il putamen e la SNpc. I gangli della base sono importanti per la coordinazione dei movimenti.

Nella MdP la SNpc, che è in connessione ampia con il gangli della base, sembra essere molto coinvolta. In pazienti con MdP, questa zona si riduce a causa della morte dei neuroni (Armstrong, 1997). Le cellule nella SNpc si proiettano ai gangli della base

attraverso la via nigro-striatale. Questa proiezione usa la dopamina come neurotrasmettitore. Ci sono sei vie nel SNC che usano la dopamina come neurotrasmettitore. Oltre alla via nigro-striatale, ci sono i neuroni dopaminergici nello strato interno della retina. Un percorso importante si origina nel tegmento ventrale e si proietta verso amigdala, septum, nucleo accumbens, tubercoli olfattivi e la corteccia frontale. Inoltre, ci sono anche altre 2 piccole vie dopaminergiche all'interno dell'ipotalamo, e tutte le vie dopaminergiche sono colpite in larga misura nella MdP (Amstrong e Ricchard, 2008). I neuroni sopravvissuti nella SNpc contengono strutture conosciute come LB, che sono trovati nella citoplasma delle cellule e possono avere preso origine dai filamenti del citoscheletro e che contengono al loro interno  $\alpha$ -synucleina (Spillantini *et al.*, 1997). L' $\alpha$ -sinucleina è una piccola proteina presinaptica con un funzione non del tutto riconosciuta all'interno della cellula che subisce una conformazione risultando una proteina iposolubile e che è il componente maggiore dei LB (Spillantini *et al.*, 1997).

### ***1.5. ALTERAZIONI PERIFERICHE NEUROVEGETATIVE***

Oltre alle caratteristiche alterazioni motorie, la MdP si caratterizza anche per la comparsa di sintomi non motori che comprendono alterazioni del comportamento, del sonno e della sensibilità, così come alterazioni viscerali, prevalentemente disfunzioni autonome cardiovascolari, gastrointestinali e urogenitali, oltre ad alterazioni di funzioni omeostatiche legate alla termoregolazione, come la sudorazione (Edwards *et al.*, 1991; Pfeiffer, 2003; Verbaan *et al.*, 2007). Di frequente questi sintomi incidono negativamente sulla qualità della vita dei pazienti e possono essere causa di complicazioni e interferenze con il trattamento farmacologico.

Nella MdP i sintomi neurovegetativi compaiono prima di quelli motori somatici e incidono maggiormente nella qualità di vita (Chaudhuri *et al.*, 2005) e questo ha portato alla scoperta da parte della *American Academy of Neurology* di parametri per il trattamento dei sintomi non motori (Zesiewicz *et al.*, 2010). Le principali alterazioni sono state identificate in diversi organi, come la ghiandola sottomandibolare, la laringe, l'esofago, il duodeno, il pancreas, i bronchi, l'epicardio, la ghiandola surrenale, le paratiroidi e le ovaie (Beach *et al.*, 2010).

La patologia della malattia mostra che il sistema nervoso autonomo è coinvolto nelle prime fasi di essa e questo è stato osservato durante gli studi svolti su *incidental Lewy body disease* (ILDB). ILDB è una diagnosi patologica che mostra la presenza di LB nella SNpc e nel locus coeruleus in pazienti che non hanno avuto manifestazioni cliniche della MdP. Si pensa che la manifestazione della ILDB sia un precursore della MdP. Nella ILDB, il 70-100% dei casi presenta manifestazioni patologiche nel tratto toracico-sacrale del midollo spinale, così come nei gangli paravertebrali del sistema nervoso simpatico, paragonabili alla MdP. Nella patologia della ILDB è stato osservato anche il coinvolgimento dei sistemi: cardiovascolare, urinario e gastrointestinale (Klos *et al.*, 2006, Bloch *et al.*, 2006; Jain, 2011).

### **Sistema cardiovascolare**

Studi *post mortem* hanno permesso di dimostrare il coinvolgimento del sistema nervoso autonomo a livello cardiaco nella MdP. In particolare è stata osservato che in campioni prelevati dal ventricolo sinistro si ha una perdita della immunopositività per la tirosina-idrossilasi (TH) e la presenza di aggregati positivi per l' $\alpha$ -sinucleina (Amino *et al.*, 2005).

Si è visto inoltre che il 58% dei pazienti affetti da MdP presenta ipotensione ortostatica (Low, 2008), una ridotta variabilità della frequenza cardiaca e aritmie cardiache (Orimo *et al.*, 2007). Poiché questi sintomi sono descritti anche nelle prime fasi della malattia, non possono essere considerati effetti collaterali dovuti alla terapia (Goldstein *et al.*, 2005).

La presenza di  $\alpha$ -sinucleina è stata descritta anche nel nucleo dorsale motore del vago, nel nervo vago, nei neuroni pregangliari del sistema nervoso autonomo simpatico e nei nervi postgangliari simpatici dell'epicardio (Braak *et al.*, 2007; Fushijiro *et al.*, 2008).

I risultati ottenuti sottoponendo 12 pazienti parkinsoniani al test del riflesso assonico sudomotore (QSART) suggeriscono che lesioni del sistema nervoso autonomo simpatico nella MdP portino ad una perdita dei neuroni postganglionari catecolaminergici ma non di quelli colinergici (Sharabi *et al.*, 2003). Infatti, alterazioni del miocardio sono state diagnosticate per la prima volta, mediante scintigrafia del cuore, in pazienti affetti da MdP, nei quali è stata evidenziata in particolare una perdita



dei neuroni noradrenergici (Ehringer e Hornykiewicz, 1960) che aumenta con il progredire della malattia e che viene definita “*Parkinsonian Heart*” (Fornai *et al.*, 2007).

## **Vescica**

Il malfunzionamento dei neuroni del sistema nervoso periferico possono spiegare anche i sintomi urinari nella MdP. Uno studio clinico ha evidenziato aggregati di  $\alpha$ -sinucleina nelle fibre del sistema nervoso autonomo del plesso pelvico-addominale in pazienti presintomatici (Minguez-Castellanos *et al.*, 2007). I disturbi urinari si manifestano con una frequenza che varia dal 27-71% dei pazienti con MdP (Winge *et al.*, 2006; Campos-Sousa *et al.*, 2003; Singer, 1998).

Diversi studi riportano che i sintomi urinari sono dati dall'età e non dalla progressione della patologia (Lemack *et al.*, 2000) altri, invece riportano un'associazione della disabilità neurologica correlata con la MdP (Araki e Kuno, 2000; Sakakibara *et al.*, 2001). Una delle ipotesi più convincenti per le disfunzioni urinarie nella MdP, suggerisce che i gangli della base producano un effetto inibitorio nel riflesso della minzione e la perdita dei neuroni nella SNpc comporta lo sviluppo di alterazioni funzionali del muscolo detrusore (Gray *et al.*, 1995).

## **Cute**

Anche se la cute è un tessuto facilmente accessibile, finora solo pochi studi hanno esaminato il suo coinvolgimento nella MdP. In uno studio su campioni ottenuti da biopsie di pazienti parkinsoniani è stata notata una denervazione marcata di tutti gli elementi della pelle innervati dal sistema nervoso autonomo, soprattutto le ghiandole sudoripare e i vasi sanguigni (Dabby *et al.*, 2006).

Inoltre, è stata rilevata la presenza di aggregati di  $\alpha$ -sinucleina in alcune biopsie della cute prelevati da 16 pazienti affetti da MdP, anche se non vi era alcuna correlazione con la gravità della malattia. Iperidrosi o altre disfunzioni della termoregolazione fanno parte dei sintomi neurovegetativi della MdP. La frequenza della disidrosi, chiamata anche eczema disidrotico, ha una frequenza del 30-50% (Hirayama, 2006).

Studi svolti a valutare disturbi della sudorazione hanno riportato una ridotta o assente ampiezza delle risposte riflesse della cute in pazienti con MdP, soprattutto in quelli con

iperidrosi (Schestatsky *et al.*, 2006). Quest'anomalia suggerisce una diminuita innervazione colinergica delle ghiandole sudoripare. Nei pazienti con MdP la disfunzione colinergica è più pronunciata nelle sedi più colpite (De Marinis *et al.*, 2000).

### **Sistema visivo**

Le cellule della retina sono ricche di dopamina (Brandies e Yehuda, 2008). Per questo motivo, sebbene non vi siano evidenze di estese anomalie visive nella MdP, vari studi sono stati condotti a carico delle vie visive nei pazienti parkinsoniani. Le alterazioni più frequenti collegate alla vista sono la perdita della discriminazione cromatica, della sensibilità del contrasto spazio-temporale e della percezione dei colori nei contorni (Bodis-Wollner, 1997).

La relazione tra un'alterata percezione dei colori, la gravità e la durata della malattia rimane incerta a causa del ridotto numero delle osservazioni e anche perché i pazienti al momento della prova erano già in trattamento con farmaci antiparkinsoniani che avrebbero potuto influenzare i risultati. Nessuna correlazione è stata trovata tra la diminuzione della visione dei colori e un cambiamento dell'assorbimento di  $^{123}\text{I}$ -β-CIT nello striato rilevato con la SPECT, suggerendo che la disfunzione della visione dei colori non sia direttamente correlata alla degenerazione dopaminergica nigrostriatale, ma piuttosto ad una lesione extranigrale (Muller *et al.*, 1998).

Tuttavia, è stato dimostrato che i pazienti con MdP presentano variazioni fotopiche rilevate con l'elettroretinografia (ERG) correlate con lo stadio clinico della patologia (Sartucci *et al.*, 2003).

Queste anomalie potrebbero essere dovute a una diminuzione di dopamina nel SNC e a livello della retina. Studi condotti sulla retina di otto pazienti affetti da MdP, hanno evidenziato una riduzione della perdita di dopamina (DA), ma non dei suoi metaboliti come l'acido diidrossifenilacetico (DOPAC) e l'acido omovanillico (HVA) (Harnois e Di Paolo, 1990). Inoltre, in pazienti trattati cronicamente con L-DOPA i livelli di DA nella retina non erano differenti dai controlli (Harnois e Di Paolo, 2003).

Non sono stati ancora condotti gli studi per rilevare la presenza di aggregati di α-sinucleina. Questo potrebbe aiutare a capire se le anomalie nella discriminazione dei

colori e altre disfunzioni nella visione sono dovute all'alterata attività dopaminergica nella retina oppure a processi degenerativi.

### **Ghiandola surrenale**

La ghiandola surrenale ha la stessa origine ontogenetica dei gangli simpatici e la sua capsula contiene gangli e nervi autonomi. Ci sono diversi studi che dimostrano il coinvolgimento della ghiandola surrenale nella MdP (Sugie *et al.*, 2005; Wakabayashi *et al.*, 1990). Un gruppo di studiosi ha individuato in diversi pazienti la presenza di inclusioni nella midollare del surrene e hanno ipotizzato la loro correlazione con i LB (Hart e Cyrus, 1968). Nell'11% di 783 autopsie è stata evidenziata la presenza di LB e  $\alpha$ -sinucleinopatie anche nei gangli simpatici e nei fascicoli nervosi della ghiandola surrenale. In questo campione, 18 casi erano riferiti a pazienti con MdP che mostravano tutti la presenza dei LB nella ghiandola surrenale (Fumimura *et al.*, 2007).

Tuttavia, la funzionalità della ghiandola surrenale non risulta compromessa nonostante alcuni pazienti affetti da MdP presentino anche ipotensione ortostatica, causata però da alterazioni in altri distretti (Djaldeti *et al.*, 2009).

### **Sangue periferico**

La presenza di cellule microgliali attive nella SNpc (McGeer *et al.*, 1988) e di elevati livelli di citochine nei neuroni dopaminergici dello striato di pazienti affetti da MdP (Mogi *et al.*, 1996) suggeriscono che una reazione infiammatoria potrebbe essere uno dei meccanismi patogenetici della MdP. L'espressione aumentata di  $\alpha$ -sinucleina nelle cellule mononucleate del sangue periferico (Kim *et al.*, 2004) mette in relazione il SNC con il sistema immunitario periferico. Altri studi riportano un'alta espressione dell' $\alpha$ -sinucleina nelle cellule della linea eritroide tra cui eritroblasti, reticolociti, eritrociti e nel midollo osseo murino (Nakai *et al.*, 2007). Differenti studi, invece, non hanno trovato differenze nei livelli dell' $\alpha$ -sinucleina o presenza di forme modificate della proteina tra pazienti e controlli (Dabby *et al.*, 2006; Baba *et al.*, 2005).

Nella MdP un livello alto di interleuchine (IL)-6 molto probabilmente aumenta il rischio della patologia (Chen *et al.*, 2008). La proliferazione di linfociti T anomali nell'encefalo dopo il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica (BEE), potrebbe spiegare i cambiamenti immunoistochimici nei pazienti con il MdP (Djaldeti *et al.*, 2009).

## **Apparato gastrointestinale**

L'innervazione parasimpatica colinergica del tratto gastrointestinale origina da due plessi: il plesso mioenterico di Auerbach e il plesso sottomucoso di Meissner. Questi plessi sono responsabili della motilità gastrointestinale (Djaldetti *et al.*, 2009). In entrambi i plessi sono stati individuati i LB correlati con la MdP, più frequentemente nella parte inferiore dell'esofago (Beach *et al.*, 2010; Wakabayashi *et al.*, 1988). La patologia a LB è stata inoltre evidenziata nelle ghiandole sottomandibolari, nello stomaco, nel piccolo intestino, nel colon e nel retto nei pazienti affetti da MdP. La presenza di  $\alpha$ -sinucleina in questi organi sembra seguire un gradiente rostrocaudale (Beach *et al.*, 2010). I motoneuroni inibitori che rilasciano il peptide intestinale vasoattivo (VIP) e che ricevono le fibre pregangliari del nervo vago sembrano particolarmente alterati nella MdP (Braak *et al.*, 2008). I nuclei del rafe sono altrettanto coinvolti, con conseguente alterazione del controllo supraspinale della defecazione (Jain, 2011).

Poiché le alterazioni dell'apparato digerente che compaiono nel corso della MdP sono l'argomento specifico di questa tesi, esse saranno trattate in dettaglio nel capitolo successivo.

## **2. MALATTIA DI PARKINSON E ALTERAZIONI DIGESTIVE**

La disfunzione gastrointestinale, già segnalata da Sir James Parkinson nella descrizione della malattia (Parkinson, 1817), rappresenta uno dei disordini più comuni che può coinvolgere l'intero tratto digestivo con differenti manifestazioni, quali ipersalivazione, disfagia orofaringea ed esofagea, gastroparesi, dismotilità del piccolo intestino e del colon e disfunzione anorettale (Verbaan *et al.*, 2007; Chaudhuri *et al.*, 2006; Pfeiffer, 2003; Jost, 1997; Edwards *et al.*, 1993; Quigley, 2002).

La gravità dei disturbi sembra direttamente correlata allo stadio e alla durata della malattia, suggerendo che essi siano parte integrante della sua storia naturale (Verbaan *et al.*, 2007; Pfeiffer, 2003; Jost, 1997; Edwards *et al.*, 1991). Più recentemente, è stato persino ipotizzato che in alcuni pazienti la stipsi possa rappresentare un sintomo precoce della malattia (Abbott *et al.*, 2001).

Benché gli effetti della MdP sui sistemi motori somatici siano stati approfonditamente studiati, l'influenza sulla muscolatura autonoma e sulle ghiandole a livello digestivo non è stata esplorata in dettaglio e necessita tuttora di essere chiarita.

Le disfunzioni dei muscoli responsabili della deglutizione e dell'evacuazione, trovano una spiegazione fisiopatologica nelle alterazioni responsabili della MdP (Edwards *et al.*, 1992) e presentano alcune caratteristiche proprie della sindrome neurologica quali la fluttuazione durante i periodi on e off (Ashraf *et al.*, 1995), la correlazione con la gravità dello stadio della malattia e, almeno negli studi clinici, una risposta positiva alla terapia specifica con apomorfina (Mathers *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1993).

La deplezione di dopamina e la presenza dei LB che sono elementi caratteristici della MdP, sono state riscontrate anche nel plesso mienterico a vari livelli del tratto digerente (Singaram *et al.*, 1995; Wakabayashi *et al.*, 1988, 1990; Qualman *et al.*, 1984), suggerendo che le alterazioni gastrointestinali possano essere causate da un processo neurodegenerativo del sistema nervoso enterico (SNE) simile a quello che avviene nel sistema nervoso centrale (SNC) (Natale *et al.*, 2008); tuttavia, i correlati biochimici rimangono scarsamente esplorati.

Inoltre, molti neurotrasmettitori del SNC sono stati identificati anche nel SNE, tra i quali ACh, NE, DA, 5-HT, acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) e glutammato. Esistono inoltre diversi ormoni che partecipano alla regolazione delle funzioni del tratto gastrointestinale: VIP, ossido nitrico (NO), neuropeptide Y (NPY), peptide correlato al gene per la calcitonina (CGRP), galanina, motilina, adenosin trifosfato (ATP), tachichine, neurochinine, cannabinoidi e oppioidi endogeni, sostanza P, peptide rilasciante la gastrina (GRP), somatostatina, colecistochinina (CCK) e altri (Shi *et al.*, 2007; Hasler, 2006; Crowe *et al.*, 1992).

Considerando il numero elevato delle sostanze che regolano la motilità gastrointestinale e il fatto che alcune di loro si co-localizzano negli stessi terminali nervosi non è semplice individuare i neurotrasmettitori coinvolti nelle disfunzioni presenti nella MdP. Inoltre, va considerato anche il fatto che la modalità d'innervazione può variare durante lo sviluppo e che è necessario distinguere tra innervazione intrinseca ed estrinseca.

Considerando il ruolo chiave della DA nella MdD, questo neurotrasmettitore è il principale candidato per l'alterazione delle funzioni gastrointestinali. Sebbene l'intestino contenga DA (Eaker *et al.*, 1987), solo recentemente la DA è stata confermata come neurotrasmettitore enterico e intrinseco, grazie alla scoperta che in alcuni neuroni dell'intestino le immunopositività per DA, TH e DAT co-localizzano (Li *et al.*, 2004). Nei ratti la DA modula la secrezione esocrina gastrointestinale, l'assorbimento di liquidi, la motilità, il flusso sanguigno e le funzioni citoprotettive e sembra svolgere queste azioni attraverso l'attivazione dei sottotipi recettoriali D-1A, ampiamente distribuiti lungo il tratto digestivo (Vaughan *et al.*, 2000).

Nei pazienti con MdP è stata riscontrata una diminuzione di neuroni dopaminergici all'interno dei plessi mienterici (Singaram *et al.*, 1995). Questo dato è stato osservato anche negli animali trattati con MPTP e hanno dimostrato anche una significativa riduzione dei neuroni TH-positivi nel SNE di topo (Anderson *et al.*, 2007). Tramite dosaggio biochimico con HPLC, nei topi trattati con MPTP si osserva solo una diminuzione di noradrenalina (NA), mentre dopo trattamento con 6-idrossidopamina (6-OHDA), è stata riscontrata una significativa riduzione sia di NA che di DA all'interno del duodeno, del digiuno, dell'ileo e del colon (Eaker *et al.*, 1998). In campioni di colon ascendente ottenuti da pazienti con MdP è stata registrata una diminuzione di DA, ma non dei suoi metaboliti; inoltre a livello della *muscularis externa*, ma non nella mucosa

si osserva una riduzione di VIP, sostanza P e NPY (Singaram *et al.*, 1995; Tatemoto *et al.*, 1982).

Nell'alterazione gastrointestinale relativa alla MdP sembra essere coinvolto anche un altro neurotrasmettitore, la serotonina . Questa molecola è un importante modulatore della muscolatura intestinale che esplica la sua azione mediante l'interazione con diversi sottotipi recettoriali. I recettori 5-HT che sono espressi dai neuroni enterici sono: 5-HT-1A, 5-HT-2A, 5-HT-2B, 5-HT-3 e 5-HT-4 (Liu *et al.*, 2005); quest'ultimo è di particolare interesse clinico dato che i suoi agonisti si sono dimostrati efficaci come sostanze procinetiche nel trattamento del rallentato svuotamento gastrico e della costipazione, nei pazienti con MdP (Liu *et al.*, 2005).

La disfunzione gastrointestinale è un'importante caratteristica della MdP e rappresenta una delle alterazioni autonome più comuni della malattia, coinvolgente tutto il tratto digestivo con differenti manifestazioni, e ha una compromissione funzionale molto significativa per molti pazienti con la MdP (Pfeiffer, 2011).

## **2.1. DISTURBI DELLA SALIVAZIONE (*drooling*)**

La salivazione è regolata dal sistema nervoso autonomo, principalmente dal parasimpatico, e modulata dagli stimoli tattili e gustativi. L'ipersalivazione (*drooling*) è definita clinicamente come incontinenza e fuoriuscita di saliva attraverso la rima buccale. Nei pazienti con MdP, questo sintomo risulta precoce, con una frequenza intorno al 75-88% (Pfeiffer, 2003, Verbaan *et al.*, 2007), e sembra avere un'incidenza maggiore negli uomini rispetto alle donne (Pfeiffer, 2003; Scott *et al.*, 2000).

Inizialmente il paziente avverte un eccesso di saliva con qualche sporadico episodio di perdita notturna (Bateson *et al.*, 1973; Kalf *et al.*, 2011). Col passare del tempo e l'aggravarsi della patologia, si verifica un'abbondante ed eccessiva presenza di saliva, con frequente *drooling* (Edwards *et al.*, 1991), che non viene causato dall'iperproduzione della saliva, ma è il risultato di una diminuzione della frequenza e di una ridotta efficienza della deglutizione (Nóbrega *et al.*, 2008). Un'imbarazzante complicazione dell'accumularsi della saliva è la tendenza al *drooling* che viene accentuato quando il paziente è immobile e tende a piegarsi in avanti, a mantenere la testa abbassata e la bocca tendenzialmente aperta. Si possono usare diversi rimedi che

possono risultare efficaci, riducendo l'accumulo della saliva. Il semplice movimento del masticare *chewing gum* o succhiare una caramella può essere utile, anche se non sono risolutivi per un lungo periodo. Inizialmente si era ipotizzata la presenza di scialorrea (Eadie *et al.*, 1965), ma attualmente si sa che nella MdP vi è una normale o ridotta secrezione di saliva (Bagheri *et al.*, 1999; Friedman *et al.*, 2001; Pfeiffer *et al.*, 2003), ma nessuna differenza è stata osservata fra i pazienti con bocca asciutta e quelli con ipersalivazione (Bateson *et al.*, 1973). Queste osservazioni suggeriscono che un'inefficiente e incoordinata deglutizione piuttosto che un'aumentata produzione di saliva sia responsabile del *drooling* nella MdP (Jost, 1997; Pfeiffer *et al.*, 2003). Un'ulteriore prova a sostegno di questa ipotesi deriva dal fatto che si ha una maggiore frequenza di *drooling* in pazienti con disfagia (86%) rispetto a quelli senza difficoltà di deglutizione (44%) (Pfeiffer *et al.*, 2003).

## **2.2. ALTERAZIONI DENTALI**

Un aumento dell'incidenza della perdita dei denti e della difficoltà nella masticazione è stato descritto nella MdP (Nakayama *et al.*, 2004). Sono stati osservati anche l'aumento delle patologie a carico del parodonto (Schwarz *et al.*, 2006; Srivastava, 2002). Tuttavia, altri studi non riportano alcuna alterazione a livello dentale (Fukayo *et al.*, 2003). Il 24% dei pazienti con la MdP riporta anche una sensazione di bruciore nella bocca, anche se la sua eziologia è ancora incerta.

## **2.3. DISFAGIA**

Molti studi mostrano la presenza della difficoltà nella deglutizione nei pazienti affetti da MdP. Infatti, nel 30-80% dei casi ci sono alterazione della deglutizione (Edwards *et al.*, 1991; Clarke *et al.*, 1998). Alcuni ricercatori suggeriscono che la disfagia può comparire nei primi stadi della malattia, a volte anche prima della comparsa dei sintomi clinici (Potulska *et al.*, 2003; Palmer, 1974), mentre altri sostengono che la comparsa della disfagia entro un anno dall'inizio dell'insorgenza dei sintomi in un paziente può escludere una diagnosi di MdP (Müller *et al.*, 2001). La masticazione e la deglutizione richiedono una coordinata successione di contrazioni e



rilasciamenti di numerosi muscoli della bocca, della faringe e dell'esofago, funzioni che nel malato di Parkinson si presentano frequentemente alterate. Infatti, un'alterata deglutizione si riscontra spesso nei pazienti, anche asintomatici, con MdP, presentandosi clinicamente nel 50-75% dei casi (Pfeiffer, 2003, Verbaan *et al.*, 2007).

La disfagia nella MdP risulta generalmente dalle alterazioni di tutte e tre le fasi della deglutizione: orale, faringea ed esofagea che vengono controllate a differenti livelli da un meccanismo somatico, ma anche dal SN autonomo. Differenti aree del SNC sono implicate nel processo di deglutizione: 1) il centro della deglutizione, che comprende il nucleo solitario e la sostanza reticolare adiacente che si proietta al nucleo ambiguo e al nucleo dorsale del nervo vago (Miller, 1986); 2) la corteccia motoria laterale e il cervelletto (Hamdy *et al.*, 1999).

Alterazioni della motilità linguale e buccale sono spesso presenti nei pazienti con MdP con conseguente difficoltà nella formazione del bolo e difficoltà nella deglutizione. Inoltre, la situazione può peggiorare con la comparsa di tremori linguali. Le principali anomalie a livello faringeo, come risultato della bradicinesia e della rigidità, consistono in un ridotto rilasciamento dello sfintere esofageo superiore e in un alterato funzionamento del muscolo cricofaringeo (Bassotti *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2002, 2006).

A livello faringeo sono state descritte numerose anomalie che provocano una difficoltosa progressione del bolo a tale livello tra cui rallentato transito esofageo, spasmo esofageo segmentale e diffuso, contrazioni aperistaltiche, ripetute contrazioni nell'esofago prossimale, dilatazione esofagea e ridotta pressione al livello dello sfintere esofageo inferiore (Pfeiffer, 2003; Castell *et al.*, 2001; Bassotti *et al.*, 1998). Uno studio sulle alterazioni a livello esofageo nei pazienti con la MdP (Pfeiffer *et al.*, 2003) ha evidenziato la presenza di acalasia. La malattia è caratterizzata dalla perdita progressiva della peristalsi esofagea e dall'incapacità di rilasciamento dello sfintere esofageo inferiore (LES), posto al confine tra esofago e stomaco (Trugman *et al.*, 2008).

La disfagia è uno dei sintomi clinici che sembra non essere correlato con la gravità o la durata della malattia (Ali *et al.*, 1996). Questo disturbo è più evidente con i cibi solidi che con quelli liquidi e può associarsi con problemi respiratori, come tosse, soffocamento e dispnea notturna e complicazioni tracheo-polmonari, come laringite cronica, tracheo-bronchiti acute o croniche e più spesso aspirazione (Edwards, 1991).

La frequenza dell'aspirazione varia dal 15% a oltre il 50% (Ali *et al.*, 1996; Pfeiffer, 2003; Mari *et al.*, 1997) raramente complicate da polmonite (Wintzen *et al.*, 1994).

## **2.4. ALTERAZIONI GASTRICHE**

La funzione principale dello stomaco è di mescolare le particelle di cibo, al fine di ottimizzare la sua sospensione nella fase liquida e la digestione ultraluminale nell'intestino. La velocità di svuotamento gastrico è regolata da molteplici meccanismi che permettono il trasferimento del chimo nel duodeno a una velocità adeguata alla sua capacità digestiva.

In questi processi, le contrazioni del corpo gastrico e gli eventi motori coordinati dell'antro, del piloro e del duodeno sono essenziali. Se queste funzioni sono alterate, si verifica un rallentato svuotamento gastrico (gastroparesi). Nei pazienti con MdP è stato segnalato un ritardato svuotamento gastrico che può essere caratterizzato da sintomi quali gonfiore addominale postprandiale, sazietà precoce, nausea, vomito, perdita di peso e malnutrizione (Jost *et al.*, 1997; Pfeiffer, 2003, 2011; Hardoff *et al.*, 2001). Un rallentato svuotamento gastrico in questi pazienti, oltre alle manifestazioni cliniche gastrointestinali, può comportare dei seri problemi nella loro gestione terapeutica.

I pazienti con MdP spesso lamentano dispepsia e bruciore di stomaco, causati o da una ridotta peristalsi o da un reflusso gastroesofageo, molto probabilmente dovuti a dismotilità esofagea e gastrica e alla disfunzione dello sfintere esofageo inferiore (Ali *et al.*, 1996; Pfeiffer, 2003). Nei diversi stadi della MdP è stata segnalata una progressione del ritardo del tempo di svuotamento gastrico che può essere alleviata dalla somministrazione di L-DOPA (Hardoff *et al.*, 2001; Melamed *et al.*, 1999; Djaldetti e Melamed, 1996). L'elettrogastrografia ha mostrato un'alterata motilità gastrica sia nella MdP precoce sia in quella tardiva, causata probabilmente da una ridotta attività parasimpatica (Pfeiffer, 2003; Soykan *et al.*, 1999; Krygowska-Wajs *et al.*, 2000). Un altro fattore che può contribuire a un ritardo dello svuotamento gastrico è una minore assunzione quotidiana di acqua nei pazienti con MdP rispetto ai soggetti normali (Ueki e Otsuka, 2004).

## **2.5. ALTERAZIONI DELL'INTESTINO TENUE**

Attualmente si hanno poche informazioni sulla motilità del piccolo intestino nella MdP. Nei pazienti è stata riscontrata, con l'ausilio di studi manometrici e radiologici, la dilatazione del piccolo intestino (Bozeman *et al.*, 1990; Jost, 1997; Pfeiffer, 2003), ma non si conosce come questa alterazione possa essere correlata con il quadro clinico della malattia. La sensazione di gonfiore addominale avvertita da alcuni pazienti potrebbe essere considerata una conseguenza dell'alterata motilità gastrica e/o del piccolo intestino (Djaldetti e Melamed, 1996; Pfeiffer, 2003). Non è stata trovata nessuna differenza nella motilità dello sfintere di Oddi che controlla le secrezioni dal fegato, dal pancreas e dalla cistifellea nel duodeno (Hagenmüller e Classen, 1998). Uno studio ha mostrato che c'è una maggiore prevalenza di ulcere duodenali nei pazienti con MdP rispetto a soggetti sani, di pari età e sesso (Altschuler, 1996). Questo fa presupporre che, a prescindere dall'individualità dei singoli pazienti, la denervazione dopaminergica che si verifica nella MdP, sia associata al processo di formazione dell'ulcera. A conferma di questo, in un modello animale di ratto, alte dosi di MPTP, che induce una denervazione dopaminergica nell'intestino, provocano la formazione di ulcere (Ozdemir *et al.*, 2007; Szabo, 1990). Dato che nel processo di ulcerogenesi possono essere coinvolte sia vie dopaminergiche centrali che periferiche, non è ancora chiaro il meccanismo con cui l'MPTP provoca le ulcere. Comunque è stato dimostrato che l'MPTP nel ratto può alterare direttamente l'attività mioelettrica duodenale e il trasporto duodenale di bicarbonato dal duodeno prossimale a quello distale, provocando un eccesso di acido nell'ampolla duodenale e un conseguente aumento del rischio di ulcera (Szabo, 1990).

## **2.6. ALTERAZIONI DEL COLON**

La funzione principale del colon è di far progredire il suo contenuto verso il retto. Le azioni coordinate del retto, dello sfintere anale, del pavimento pelvico e dei muscoli addominali determinano l'espulsione del materiale fecale. Un'alterata motilità colica causa frequentemente costipazione, definita come ridotto movimento intestinale (due o meno evacuazioni per settimana) che si associa a difficoltosa e insufficiente

evacuazione (Pfeiffer, 2003; Jost e Eckardt, 2003). La costipazione è un sintomo comune nei pazienti con MdP, con una frequenza intorno all'80% (Verbaan *et al.*, 2007; Bassotti *et al.*, 2000; Kaye *et al.*, 2006; Siddiqui *et al.*, 2002), con un tempo di transito più che raddoppiato rispetto ai soggetti di controllo. La stipsi si può verificare in tutte le fasi della MdP, anche prima dell'insorgenza dei sintomi motori (Chaudhuri *et al.*, 2005; Verbaan *et al.*, 2007).

Recentemente è stato dimostrato che la diminuita frequenza dei movimenti intestinali negli anziani può essere associata con un maggior rischio di sviluppare la MdP (Abbott *et al.*, 2001). Ciò supporta il concetto che la MdP sia un disturbo sistemico multiplo in cui la disfunzione motoria non è necessariamente la prima e più grave alterazione, arrivando al paradosso di MdP *senza* parkinsonismo. Questo comporta la necessità di sviluppare una terapia organo-mirata basata sul sistema primariamente e maggiormente colpito in ogni paziente.

La costipazione negli stadi più tardivi della malattia è considerata spesso come un effetto collaterale della terapia sostitutiva della DA. Comunque anche i pazienti non sottoposti a nessun trattamento farmacologico hanno un ritardo del transito colico e costipazione (Abbott *et al.*, 2001; Verbaan *et al.*, 2007), suggerendo che la costipazione nella MdP è correlata a un coinvolgimento diretto della muscolatura del colon e non agli effetti collaterali della terapia (Pfeiffer, 2003). Non è stata trovata nessuna correlazione fra i sintomi della costipazione e la gravità della MdP (Jost *et al.*, 1994; Verbaan *et al.*, 2007), ma ci sono alcuni studi che suggeriscono che la costipazione aumenti con la progressione della MdP (Verbaan *et al.*, 2007).

Altri fattori che possono contribuire alla costipazione sono la ridotta assunzione di fibre e di acqua, conseguenza di una diminuita sensazione di sete, la mancanza di esercizio fisico, un ridotto tono del diaframma e dei muscoli addominali e un'associata disfunzione neurovegetativa (Ueki *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 1991).

I neuroni intrinseci del colon rappresentano un bersaglio della MdP come indicato dalla presenza dei LB nel plesso mienterico (Kupsky *et al.*, 1987; Jost *et al.*, 1994) e come testimoniato dalla perdita di questi neuroni che può condurre a inerzia colica (Pfeiffer, 2003) o all'avvento, in alcuni casi, di megacolon (Caplan *et al.*, 1965; Kupsky *et al.*, 1987; Lewitan *et al.*, 1951). D'altro canto, la costipazione di per sé può raramente portare alla pseudo-ostruzione (Shimada *et al.*, 2006; Marinella *et al.*, 1997) o al

volvolo (Pfeiffer, 2003; Jost 1997; Rosenthal e Marshall, 1987). Gli studi con bario e l'endoscopia non sono riusciti a rivelare un'ostruzione o un'altra anomalia della mucosa in nessuno dei pazienti con MdP (Byrne *et al.*, 1994).

## **2.7. DISFUNZIONE ANORETTALE**

L'atto della defecazione presenta delle similitudini con la deglutizione, necessitando di una seria coordinata di contrazioni e rilasciamenti di gruppi muscolari. La difficoltà nella defecazione, associata con costipazione è caratterizzata da sforzo eccessivo ed evacuazione dolorosa e insufficiente, è stata osservata in differenti stadi della MdP (Pfeiffer, 2003; Bassotti *et al.*, 2000). Le anomalie della funzione defecatoria nella MdP, studiate con differenti tecniche, comprese la manometria anorettale, l'elettromiografia dello sfintere anale e la defecografia, hanno rivelato un'alterata coordinazione dei processi di contrazione e rilascio dei muscoli addominopelvici e puborettali e una compromessa funzione dello sfintere anale (Crowell, 2004; Wald, 2004; Jost *et al.*, 1997). Non è stata confermata la correlazione della disfunzione defecatoria con la gravità e la durata della MdP (Edwards, 1991; Jost *et al.*, 2010).

## **2.8. PERDITA DI PESO**

La perdita di peso viene riportata frequentemente nei pazienti con MdP, soprattutto nelle donne (Durrieu *et al.*, 1992). Inoltre è stata documentata la perdita di peso nel 52% di pazienti affetti da MdP (Abbott *et al.*, 1992). Il motivo di questo fenomeno non è stato ancora spiegato. Si pensa che la causa sia dovuta a una riduzione dell'apporto energetico ma anche a un aumento del dispendio energetico (Pfeiffer, 2003).

Tuttavia è stata descritta in alcuni pazienti anche un aumento del peso. Nei pazienti sottoposti a stimolazione profonda del nucleo subtalamico è stata osservata nei tre mesi successivi all'intervento un aumento di peso (Tuite *et al.*, 2005). Talvolta si osserva anche un aumento di peso dovuto a un'assunzione compulsiva di cibo in quei pazienti in trattamento con agonisti dopaminergici (Nirenberg e Waters, 2006).

### ***3. PARALLELISMO FRA LESIONI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE ED ENTERICO NELLA MALATTIA DI PARKINSON***

Le malattie neurodegenerative possono estendersi fuori dal SNC coinvolgendo anche il SNE. A tal proposito, diverse analogie anatomo-patologiche sono state riscontrate fra il SNC e quello enterico (tabella.1.). Sembra che l'intestino abbia gli stessi marker per la neurodegenerazione. Infatti, sia nel SNC che nel SNE sono presenti le proteine misfolded, il cui meccanismo di diffusione è comune da cellula a cellula e può avvenire attraverso un processo del simil-prionico. In entrambi i sistemi le proteine misfolded si propagano attraverso questi passaggi:

- 1.formano aggregati.
- 2.sono espresse sulla membrana plasmatica.
- 3.sono secrete nello spazio extracellulare.
- 4.sono glicate per formare il prodotto finale della glicazione AGE.
- 5.vengono internalizzate attraverso specifici recettori posti sulle cellule vicine (RAGE).
- 6.vengono eliminate attraverso l'autofagia.
- 7.sono neurotossiche.

Queste caratteristiche sono comuni anche per l' $\alpha$ -sinucleina nella MdP, per altre sinucleinopatie, per la  $\beta$ -amiloide e la tau (nella demenza degenerativa), per SOD-1 e TDP43 (nella sclerosi laterale amiotrofica, SLA), e PrPsc nelle patologie da prioni. Diversi studi hanno evidenziato una concomitante perdita di neuroni in una varietà di sistemi oltre il bersaglio principale, che è il cervello. Inoltre, le malattie neurodegenerative si estendono al di fuori del SNC, diventando così malattie sistemiche i cui i risultati clinici e patologici coinvolgono aree esterne del SNC. Questo spiega perché nei disturbi del movimento i sintomi motori compaiono all'inizio della patologia (Natale *et al.*, 2008). Tali sintomi comprendono disturbi del tratto gastrointestinale (GI) con alta prevalenza e grave compromissione della qualità della vita. I sintomi GI nelle malattie neurodegenerative sono associati a gravi alterazioni patologiche nell'intestino. L'insorgenza di alterazioni GI rispetto a disfunzioni del SNC possono variare e la neuropatologia può iniziare sia nell'intestino che all'interno del SNC, per progredire,

poi, verso il SNC o l'intestino e viceversa (Natale *et al.*, 2011). Molto importante risulta l'alta frequenza con cui si verifica un coinvolgimento parallelo tra l'intestino e il SNC nella neuropatologia. Il tratto GI è maggiormente interessato nel SNE che ha una configurazione costituita da reti neuronali che ricordano il SNC ( Wedel *et al.*, 1999; Furness 2006). Infatti, nella MdP si ipotizza che la degenerazione nel SNE rispecchia e precede analoghi eventi patologici nel cervello o nel midollo spinale.(Braak *et al.*, 2003, 2006, 2007). In linea con questa ipotesi, la neuropatologia nella MdP potrebbe diffondersi dal SNE al SNC (Braak *et al.*, 2003). Ciò significa che il SNE è la porta d'entrata per il processo patologico che si verifica prima nell'intestino e in seguito si diffonde al SNC. Tuttavia è anche probabile, in alcuni casi, che il coinvolgimento del SNE nella MdP possa svolgersi in maniera analoga al SNC (Natale *et al.*, 2011). Nella **Figura A.** si prendono in esame diverse vie patologiche che possono essere comuni sia al SNC che a quello enterico nelle malattie neurodegenerative (Natale *et al.*, 2011). Da un punto di vista molecolare, si osservano gli stessi aggregati proteici sia nel SNE che nel SNC durante la neurodegenerazione. Tali aggregati si trovano all'interno del SNE in pazienti che non presentano una compromissione del SNC (Natale *et al.*, 2008), suggerendo così che la malattia possa effettivamente iniziare a livello intestinale. Poiché la struttura molecolare delle proteine misfolding che si trovano in aggregati proteici ricorda la proteina prionica, si è ipotizzato che la diffusione progressiva della neurodegenerazione potrebbe essere simile alle patologie prioniche (Cushman *et al.*, 2010; Chiocchetti *et al.*, 2008). Questo è supportato anche da recenti scoperte che mostrano come sia la patologia che la sua trasmissione all'interno del SNC siano simili alle patologie da prioni nella MdP, nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA), e la malattia di Alzheimer (AD) (dove la  $\beta$ -amiloide si diffonde da cellula a cellula all'interno del cervello) (Cushman *et al.*, 2010; Chiocchetti *et al.*, 2008). Anche se il processo di diffusione simil-prionico è stato dimostrato, la sua origine rimane ancora non chiara. È stato ipotizzato che l'intestino stesso possa rappresentare la fonte di patogeni tradizionali o atipici (agenti infettivi o proteine alterate) (Chiocchetti *et al.*, 2008). Questa ipotesi è stata dimostrata per la proteina prionica patogenica (PrPc) (Chiocchetti *et al.*, 2008), ed è stata ipotizzata anche per la SLA (Longstreth *et al.*, 2005) e la MdP, che sono caratterizzate da proteine misfolding a causa di un dominio simil-prionico. Questo punto è fondamentale per comprendere a fondo i meccanismi di

degenerazione nel SNE, la genesi di malattie neurodegenerative, e la topografia progressiva del reclutamento del SNC. Soprattutto, quest'intuizione potrebbe gettare nuova luce sullo sviluppo di terapie razionali sia per le patologie del tratto gastrointestinale che per quelle neurodegenerative. L'ipotesi di trasmissibilità delle malattie neurodegenerative sta portando a riconsiderare i futuri approcci terapeutici. (Natale *et al.*, 2011).

Possiamo considerare alcuni marcatori neuronali per analizzare le malattie neurodegenerative all'interno del SNE e del SNC. Alcune proteine, come  $\alpha$ -sinucleina,  $\beta$ -amiloide, rame, zinco superossido dismutasi 1 (SOD-1), tau o PrPc, sono normalmente espresse nei neuroni, ma il loro ruolo fisiologico non è completamente compreso. L'alterazione e/o l'accumulo di queste proteine è responsabili dell'insorgenza di varie patologie neurodegenerative. Queste proteine risultano accumulate e misfolded a causa di (1) alterazioni strutturali (indotte da mutazioni genetiche o tossine ambientali) e (2) la mancanza di meccanismi di compensazione efficaci come la via autofagica e il sistema dell'ubiquitina-proteasoma, che potrebbe convergere in un unico organulo, che recentemente è stato descritto come autofagoproteasoma.



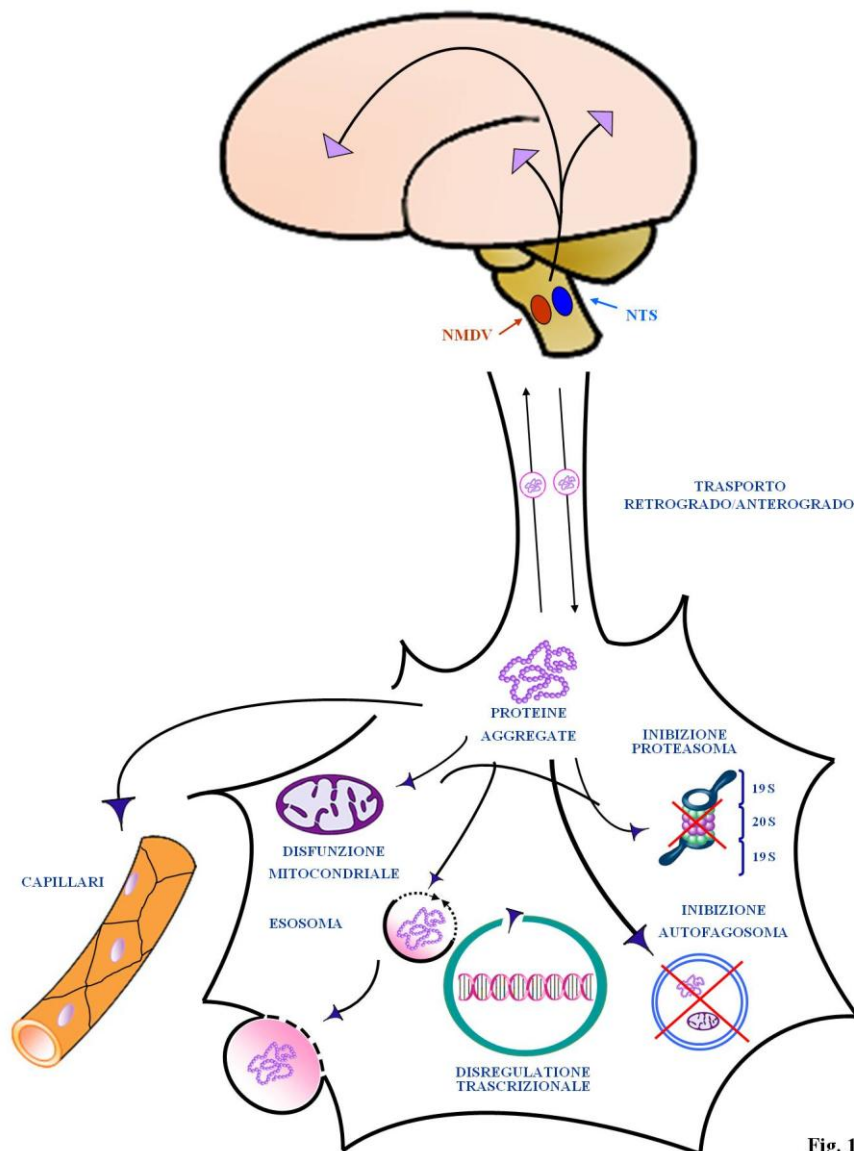


Fig. 1

**Figura A.** L'intestino sembra essere la porta d'entrata nelle patologie neurodegenerative. Nella MdP si ipotizza che la degenerazione nel SNE rispecchi e preceda analoghi eventi patologici nel cervello o nel midollo spinale (Braak *et al.*, 2003, 2006, 2007). In questo scenario, come mostrato nella figura, il SNE può rappresentare la via di accesso per processi patologici che originano precocemente nell'intestino e tardivamente si diffondono nel SNC attraverso il sistema nervoso autonomo e/o attraverso il circolo sanguigno. In questo modo, aggregati proteici possono essere trasferiti al tronco encefalico mediante un trasporto anterogrado lungo fibre afferenti al nucleo del tratto solitario o mediante un trasporto retrogrado attraverso gli assoni efferenti che originano dal nucleo dorsale motore del nervo vago. La presenza di questi aggregati nel SNE dei pazienti asintomatici suggerisce che la patologia possa originare nel tratto GI. Questo concetto è confermato dalle recenti scoperte che le malattie neurodegenerative progrediscono come patologie prioniche (Olanow e Prusiner, 2009; Cushman *et al.*, 2010). L'ipotesi che l'intestino da solo possa rappresentare la sorgente per una patogenesi tradizionale o atipica (agenti infettivi o proteine alterate) che raggiunge il SNC per via retrograda attraverso i nervi/vasi sanguigni, richiede una particolare attenzione (Chiocchetti *et al.*, 2008). Modificato da Natale *et al.* (2011).

In analogia con le scoperte patologiche della MdP nel SNC, la presenza dei LB è stata descritta anche nei plessi mienterico e sottomucoso del tratto gastrointestinale (Kupsky *et al.*, 1987; Wakabayashi *et al.*, 1993; Singaram *et al.*, 1995; Jost *et al.*, 1994), suggerendo che la MdP colpisca anche il SNE provocando di conseguenza lo sviluppo della dismotilità esofagea e della costipazione. L'identificazione di recettori dopaminergici nell'esofago e in particolare nello sfintere esofageo inferiore, e il fatto che nei pazienti con MdP si abbia una diminuzione del numero di neuroni DAergici nel plesso mienterico, confermano un ruolo importante della DA nel mantenimento di una normale motilità gastroesofagea e colica (Kupsky *et al.*, 1987; Wakabayashi *et al.*, 1993; Singaram *et al.*, 1995). Nei pazienti con costipazione cronica (Singaram *et al.*, 1995) è stata riscontrata una perdita di neuroni DAergici mienterici e la presenza di LB, soprattutto all'interno di neuroni VIP- e TH-positivi. In un recente studio, è stata analizzata la presenza di aggregati di  $\alpha$ -sinucleina, come precursore dei LB, nel plesso addominale e pelvico di un campione randomizzato di persone, nel tentativo di stabilire se esiste una correlazione tra la presenza di tali aggregati e il successivo sviluppo di alterazioni neurologiche. I risultati hanno mostrato che la presenza di aggregati nei neuroni autonomi periferici può rappresentare una fase presintomatica precoce nello sviluppo delle malattie con LB (Minguez-Castellanos *et al.*, 2007; Goetze e Woitalla 2008).

Ci sono alcuni studi che indicano che i neuroni autonomi possono essere colpiti prima o per lo meno simultaneamente rispetto a quelli all'interno dei gangli della base: una diminuzione dei movimenti intestinali nelle persone anziane è stata associata con un rischio maggiore di sviluppare MdP (Abbott *et al.*, 2001) e i sintomi motori della MdP si possono manifestare anche dopo dieci anni dalla comparsa delle disfunzioni autonome, compresi i disturbi gastrointestinali (Kaufmann *et al.*, 2004).

<b>SNC del parkinsoniano</b>	<b>Disfunzioni gastrointestinali del parkinsoniano</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Riduzione di TH, di DA e dei suoi metaboliti a livello striatale</li> <li>- Perdita di neuroni DAergici nella <i>substantia nigra pars compacta</i></li> <li>- Degenerazione delle fibre DAergiche della via nigrostriatale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuzione dei livelli di DA</li> <li>- Perdita di neuroni TH-positivi</li> <li>- Degenerazione delle fibre catecolaminergiche</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuzione dei livelli di NA e degenerazione delle fibre NAergiche in varie regioni del cervello</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuzione dei livelli di NA</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perdita di neuroni NAergici nel <i>locus coeruleus</i></li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inclusioni neuronali all'interno dei neuroni contenenti alfa-sinucleina (LB)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inclusioni neuronali simili ai LB trovati all'interno dei plessi enterici dall'esofago fino a retto</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sintomi non motori: decadimento cognitivo, apatia, depressione, anedonia, affaticamento, disturbi del sonno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ipersalivazione, disfagia, gastroparesi, dispepsia, pirosi, stipsi</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- I sintomi motori possono comparire anche 10 anni dopo l'insorgenza dei disturbi gastrointestinali</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'insorgenza dei disturbi gastrointestinali può avvenire anche 10 anni prima dei sintomi motori</li> </ul>

**Tabella 1.** Alterazioni nell'encefalo e nel tratto gastrointestinale relative al parkinsonismo (Natale *et al.*, 2008).

## **4. STRATEGIE TERAPEUTICHE NEL TRATTAMENTO DEI SINTOMI DIGESTIVI NELLA MALATTIA DI PARKINSON**

A causa della scarsità delle ricerche sperimentali e della novità del presente tema, sia nel campo clinico che nella ricerca, gli approcci terapeutici per il trattamento delle disfunzioni gastrointestinali nella MdP sono pochi e causano ancora effetti collaterali gravi. Un trattamento efficace è necessario e per avere questo serviranno ulteriori analisi sulla disfunzione dopaminergica nel tratto gastrointestinale e ulteriori ricerche indirizzate a comprendere i meccanismi che stanno alla base dei danni nel tratto gastrointestinale presenti nei malati di Parkinson.

Tradizionalmente, per ridurre l'eccesso di produzione di saliva e il *drooling* vengono utilizzati farmaci anticolinergici (triexifenidil, benztropina), ma gli effetti collaterali che ne conseguono limitano il loro utilizzo (disturbi visivi, secchezza delle mucose, ritenzione idrica, costipazione, perdita di memoria, confusione, allucinazioni).

Il trattamento con somministrazione sublinguale con farmaci anticolinergici (Hyson *et al.*, 2002; Thomsen *et al.*, 2007) può ridurre l'iperproduzione della saliva senza causare dei danni collaterali. Inoltre, l'iniezione con tossina botulinica nelle ghiandole salivari, ha già mostrato che riduce la produzione della saliva, con un miglioramento che dura da sette settimane a sette mesi ((Pfeiffer *et al.*, 2003; Truong e Jost, 2006). Infine, anche la chirurgia, come per esempio la neurectomia della corda del timpano, è stata adoperata ma ha effetti collaterali, come per esempio la perdita della sensibilità gustativa nei due terzi anteriori della lingua e non assicura un'efficacia a lungo termine (Mullins *et al.*, 1979). Recentemente ha passato il primo trial, il trattamento con il Glicopirrolato rispetto a placebo, in pazienti parkinsoniani con ipersalivazione (Arbouw *et al.*, 2010). Per facilitare lo svuotamento gastrico e diminuire il reflusso gastrico e la costipazione nei pazienti vengono somministrati gli antagonisti della dopamina come farmaci procinetici (Melamed *et al.*, 1999). Tra questi, il farmaco comunemente utilizzato è il domperidone e, meno frequentemente, la metoclopramide. Questi ultimi due farmaci sono entrambi bloccanti del recettore D<sub>2</sub>, ma il primo ha una capacità ridotta di attraversare la barriera ematoencefalica e quindi risulta meno sicuro nel trattamento dei

pazienti. La cisapride, un altro farmaco usato negli Stati Uniti, è stato ritirato dal commercio perché è cardiotossico.

Per il trattamento della costipazione, il primo passo da percorrere è sicuramente quello di aumentare il consumo di alimenti ricchi di fibre o di integratori di fibre (metilcellulosa, psillio) e l'assunzione di liquidi. Il passo successivo consiste nell'uso di sostanze che ammorbidiscono le feci e successivamente di lassativi osmotici (sorbitolo, lattulosio, polietilenglicole) (Pfeiffer, 2003; Jost, 2010).

È stato osservato che la somministrazione di apomorfina migliora significativamente i parametri manometrici, suggerendo un ruolo per la DA nel mantenimento di un'appropriata funzione anorettale (Mathers *et al.*, 1989). La tossina botulinica provoca l'inibizione della contrazione della muscolatura liscia nel tratto GI, ed è stata utilizzata con successo nei malati di Parkinson nel trattamento delle disfunzioni anorettali (Pfeiffer, 2003; Møller *et al.*, 2011)

Poiché la stimolazione dei recettori 5-HT<sub>4</sub> aumenta il rilascio di ACh e CGRP dai terminali nervosi nel tratto GI, gli agonisti 5-HT<sub>4</sub> vengono utilizzati come farmaci procinetici. Recentemente nell'Uomo sono stati testati il tegaserod (agonista parziale del recettore 5-HT<sub>4</sub>) e il citrato di mosapride (agonista selettivo del recettore 5-HT<sub>4</sub>); ma il primo è stato ritirato dal commercio negli Stati Uniti perché aumentava il rischio di attacchi cardiaci e di ictus (Morgan e Sethi, 2007).

Benché il ruolo della DA nella motilità gastrointestinale non sia ancora del tutto chiaro, dovrà essere preso in considerazione nella ricerca di un potenziale trattamento efficace contro le disfunzioni gastrointestinali relative alla MdP. La diminuzione dei livelli di DA e dei recettori D<sub>1</sub> può essere compensata tramite la somministrazione di agonisti selettivi D<sub>1</sub>. L'apomorfina, un agonista DAergico misto che stimola sia recettori D<sub>1</sub> che D<sub>2</sub> (De Keyser *et al.*, 1995), è efficace a livello centrale per il trattamento delle sindromi motorie "on-off" che conseguono a un lungo trattamento con L-DOPA. Allo stesso tempo l'azione degli agonisti misti sembra essere efficace anche nel migliorare la motilità intestinale. Uno studio recente dimostra dei miglioramenti per la costipazione anorettale nei pazienti con MdP, trattati con la L-DOPA (Tateno *et al.*, 2011).

Ultimamente l'infusione intradigiunale di gel levopoda/carbidopa (Honig *et al.*, 2009, Fasano *et al.*, 2012) sembra ridurre i sintomi motori e non motori nella MdP. Un

aumento dei livelli di DA può essere ottenuto anche tramite l'iniezione diretta di L-DOPA nel duodeno (Mouradian, 2005; Djaldetti e Melamed, 1998).

È importante, infine, tenere presente che la perdita di cellule DAergiche non significa solamente perdita di DA, ma anche di una varietà di co-trasmettitori, peptidi e siti di captazione che possono essere importanti modulatori dell'attività intestinale. Nei futuri progetti sperimentali dovranno pertanto essere tenuti in considerazione anche questi potenziali bersagli farmacologici.

## 5. MODELLI SPERIMENTALI DI MALATTIA DI PARKINSON

Nonostante gli innumerevoli sforzi volti a individuare la causa della neurodegenerazione selettiva delle cellule dopaminergiche della SNpc, il meccanismo che ne sta alla base è ancora sconosciuto. La ricerca eziopatogenetica sui pazienti parkinsoniani è limitata dalle difficoltà e dalla lunghezza dei tempi di raccolta dei dati, essendo tali studi puramente di carattere epidemiologico. Inoltre, anche dal punto di vista biochimico e morfologico, la ricerca è limitata dalla disponibilità di campioni di tessuto cerebrale da analizzare che sono, ovviamente, soltanto preparati autoptici. Per comprendere, quindi, la fisiopatologia di questa malattia e per sperimentare nuove terapie, da tempo molti ricercatori si sono affidati a modelli animali. Un buon modello di MdP deve soddisfare almeno 3 requisiti:

- 1) riduzione dei livelli di dopamina (DA) nello striato;
- 2) perdita di neuroni dopaminergici nella SNpc, e in particolare nella sua parte più ventrale;
- 3) presenza di inclusioni neuronali, note come LB, in determinate aree cerebrali.

La creazione di modelli sperimentali di MdP si avvale di tossine dopaminergiche, come l'MPTP, la metanfetamina (MA) e la 3,4-metilenediossimetanfetamina (MDMA), più comunemente nota come *Ecstasy*. Altre sostanze che possiedono un meccanismo d'azione simile, sono rispettivamente il paraquat, il rotenone, l'epoxomicina e altri modelli possono essere ottenuti mediante microinfusioni in striato, nella SNpc, o nel fascio mediano del proencefalo di 6-OHDA. Nessuno dei modelli esistenti è in grado di riprodurre per intero tutti i fenomeni che caratterizzano la MdP; soltanto l'MPTP, neurotossina identificata nei primi anni '80 come contaminante dell'eroina sembra causare un quadro anatomo-patologico, biochimico e clinico simile a quello della malattia umana (Langston e Ballard, 1983), ed è per questo che è la tossina maggiormente utilizzata. Anche gli altri modelli danno un contributo per comprendere la malattia. Più recentemente sono stati introdotti modelli sperimentali che si basano sulla somministrazione dell'epoxomicina, un inibitore del sistema ubiquitina-proteasoma, e di tossine ambientali, tra cui il paraquat, un erbicida, e il rotenone, un

insetticida organico utilizzato in agricoltura, noto per essere uno dei più potenti inibitori del complesso I mitocondriale (Drolet *et al.*, 2009). La somministrazione di queste sostanze nei roditori induce la distruzione selettiva dei neuroni dopaminergici nigrostriatali e l'accumulo di depositi intraneuronali di  $\alpha$ -sinucleina (Fornai *et al.*, 2003; Petrovitch *et al.*, 2002; Betarbet *et al.*, 2000).



## **PARTE SPERIMENTALE**

## 6. INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO

L'intero tratto GI può essere affetto nella MdP, con ipersalivazione, disfagia orofaringea ed esofagea, gastroparesi, dismotilità del piccolo intestino e del colon e disfunzione anorettale. Comunque, il sintomo più comune è la costipazione (Edwards *et al.*, 1991; Jost, 1997; Pfeiffer, 2003, Natale *et al.*, 2008).

È stato ipotizzato che queste disfunzioni del tratto GI possano dipendere da un processo degenerativo del SNE, analogamente a quanto accade nel SNC (Singaram *et al.*, 1995; Wakabayashi *et al.*, 1988).

L'eterogeneità delle alterazioni del tratto GI nella MdP, le poche conoscenze circa il ruolo che rivestono i sistemi noradrenergico e dopaminergico a livello intestinale hanno reso necessario lo sviluppo di un opportuno modello animale che permetta l'indagine più approfondita di queste disfunzioni. A oggi, la maggior parte degli studi riguardano le alterazioni del sistema nigro-striatale ma pochi studi sono stati condotti sulle alterazioni del tratto GI nella MdP, sebbene queste siano critiche nella qualità della vita dei pazienti.

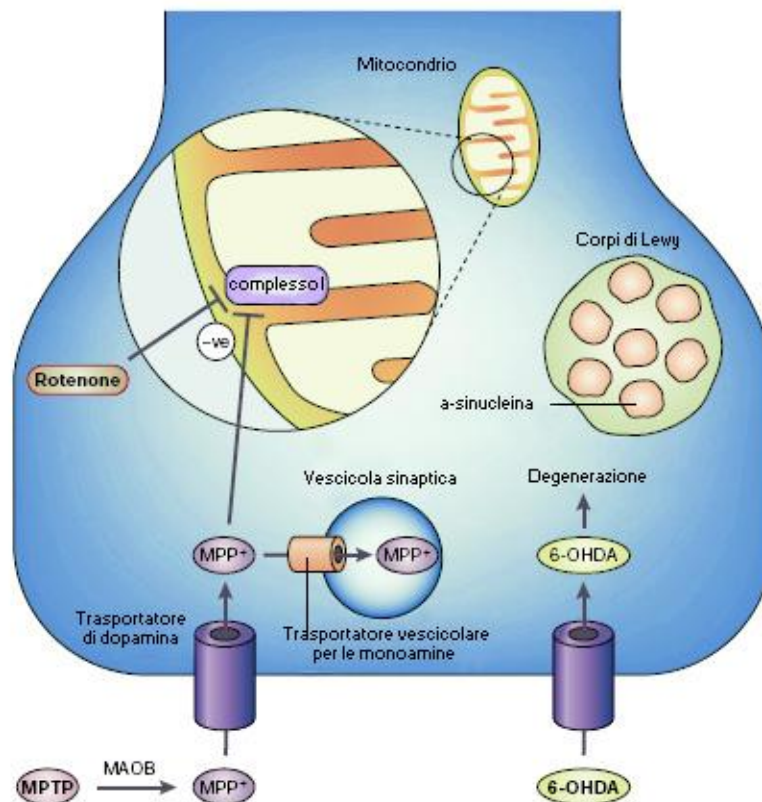
Negli ultimi decenni sono stati effettuati studi sugli effetti gastrointestinali nella MdP indotti dalla somministrazione di neurotossine. Sono stati valutati gli effetti della MPTP *in vivo* nel colon di topi (Anderson *et al.*, 2007): a dieci giorni dal trattamento si registra una riduzione del 40% dei neuroni positivi alla TH. Inoltre, è stata evidenziata una perdita dei neuroni mioenterici nei ratti in seguito a esposizione cronica al rotenone (Drolet *et al.*, 2009). Infine, sia nelle scimmie affette da MdP (Purisai *et al.*, 2005; McCormack *et al.*, 2008) che nei topi trattati con MPTP (Kühn *et al.*, 2003) si verifica un aumento dell'espressione dell' $\alpha$ -sinucleina nella via nigro-striatale. Questa iperespressione dell' $\alpha$ -sinucleina è stata evidenziata a livello dell'intestino dei topi trattati con rotenone (Drolet *et al.*, 2009).

Non è chiaro se il danno dei neuroni positivi alla TH riguardi nello specifico neuroni noradrenergici, dopaminergici oppure adrenergici.

Relativamente al modello di topi trattati con MPTP, rimangono dei punti ancora da chiarire: (i) quale sia il sito specifico nella parete del tratto GI in cui il trattamento con MPTP induce neurodegenerazione, (ii) se i neuroni che degenerano appartengano alla

sottomucosa, oppure siano localizzati nel plesso mienterico, o ancora se siano distribuiti nell'intera parete intestinale.

L'MPTP è una potente neurotossina dopaminergica con effetti simili in molte specie animali, dai topi (Heikkila *et al.*, 1984) ai primati non umani, all'uomo (Ballard *et al.*, 1985). Il meccanismo di neurotossicità da MPTP prevede la sua attivazione da parte delle MAO-B in 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>; Ciba *et al.*, 1984). L'MPP<sup>+</sup> riesce a penetrare nei neuroni dopaminergici della via nigrostriatale sfruttando l'elevata affinità per la molecola responsabile della ricaptazione della dopamina, e una volta all'interno del neurone dopaminergico inibisce il complesso I della catena respiratoria mitocondriale, causando la morte di questi neuroni (Nicklas *et al.*, 1987). In questo modo, il trattamento con MPTP provoca la degenerazione selettiva dei neuroni dopaminergici nigrali in varie specie animali, soprattutto nei primati (Langston e Ballard, 1983; Crossman *et al.*, 1989) e nel topo (Fornai *et al.*, 2005). **Figura B.**



**Figura B.** Rappresentazione schematica della patogenesi del danno neuronale indotto da neurotossine (da Beal, 2001; modificato).

In realtà, nonostante siano stati condotti numerosi studi per comprendere l'eziologia del danno a livello del SNC, esistono pochi lavori che indagano sui meccanismi dei sintomi gastrointestinali presenti nella MdP; sintomi che per altro sono critici per la qualità della vita del paziente. La scarsità di tali studi limita fortemente la comprensione della fisiopatologia dei disturbi gastrointestinali legati alla MdP e di conseguenza il loro trattamento.

Uno dei modelli di parkinsonismo sperimentale maggiormente caratterizzato si basa sull'esposizione alla neurotossina MPTP. In un modello di Szabo *et al.* (1985) l'MPTP, iniettato per via intraperitoneale nel ratto, provoca ulcera duodenale, inibizione dell'attività elettrica duodenale e una diminuzione della secrezione di acidi gastrici e pancreatici. Nello stesso modello, Eaker *et al.* (1987) hanno trovato interruzione cronica del complesso mioelettrico migrante e protrazione dell'irregolare attività elettrica. Inoltre, somministrando dosi di MPTP molto più alte rispetto a quelle necessarie per provocare l'interruzione cronica dell'attività del complesso mioelettrico migrante, è stata riscontrata una significativa diminuzione nei livelli di DA all'interno del plesso mioenterico del digiuno, mentre i livelli di DA nel CNS risultavano invariati, facendo ipotizzare un maggior coinvolgimento da parte del SNE rispetto al SNC. Tale risultato può essere spiegato dal fatto che i ratti non risultano sensibili alla tossina, probabilmente per una ridotta attività cerebrale delle MAO-B e la maggiore attività del trasportatore vescicolare per le monoamine (VMAT2) - uno dei meccanismi cellulari di difesa dalla tossicità dell'MPP+ - che caratterizzano il ratto (Staal *et al.*, 2000), mentre nel topo e nei primati l'MPTP induce danno dopaminergico anche nel sistema centrale nigrostriatale.

In uno studio *in vitro*, Hanani (1990) ha dimostrato che l'MPTP è in grado di indurre rilascio muscolare nel colon di topo, effetto presumibilmente attribuibile alla liberazione di NA dai terminali nervosi. Recentemente, gli effetti dell'MPTP sul colon di topo sono stati valutati anche *in vivo* da Anderson *et al.* (2007). Gli autori hanno mostrato che dopo dieci giorni dalla somministrazione di MPTP alla dose di 60 mg/kg, si ha una riduzione del 40% dei neuroni dopaminergici enterici, associata ad alterazioni comportamentali ed elettrofisiologiche, che consistono in un'aumentata produzione di feci e una maggiore motilità colica, mentre non è stato notato nessun effetto sullo svuotamento gastrico. Questi dati sono in accordo con il fatto che i neuroni

dopaminergici enterici nei roditori hanno un ruolo inibitorio (Li *et al.*, 2004), ma non spiegano il rallentamento dello svuotamento gastrico e della costipazione riscontrata frequentemente nei pazienti affetti da MdP. Queste discrepanze sono state attribuite alle intrinseche differenze del ruolo della DA nel SNE umano rispetto a quello murino (Anderson *et al.*, 2007)

Lo scopo dello studio è stato quello di riprodurre sperimentalmente nel topo le disfunzioni gastrointestinali della MdP, somministrando 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), una neurotossina in grado di indurre parkinsonismo. Una volta indotto il danno funzionale, abbiamo analizzato le alterazioni morfologiche nel SNC ed enterico del topo che si riscontrano anche nei pazienti affetti da MdP.

Sono stati prelevati campioni di esofago, stomaco, duodeno e colon. In questo studio preliminare sono riportati i dati relativi al solo duodeno, in attesa di completare lo studio delle altre parti dell'apparato digerente.

## **7. MATERIALI E METODI**

### **7.1. ANIMALI**

In questo studio sono stati impiegati 20 topi C57 Black maschi, di 9 settimane, peso medio 25 g ottenuti dalla ditta (HARLAN Italy, San Pietro al Natisone, Udine, Italia). Gli animali sono stati stabulati in numero di cinque per gabbia con cicli di luce-buio di 12 ore ciascuno e forniti di cibo e acqua *ad libitum*. Gli studi sugli animali hanno rispettato la normativa italiana che disciplina la protezione degli animali o ad altri fini scientifici (D.L.116/92).

### **7.2. TRATTAMENTO CON MPTP**

Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali:

Controlli N = 10

Somministrazione cronica di MPTP (N = 10): 5 mg/Kg, i.p. due volte al giorno (9:00 h; 17:00 h) per tre settimane;

L'MPTP (Sigma Chemicals CO., ST. Louis, MO, USA) è stato disciolto in soluzione salina allo 0,9%. I topi di controllo sono stati trattati con lo stesso volume di salina e con le stesse modalità degli animali trattati con MPTP.

### **7.3. TEST COMPORTAMENTALI**

Al fine di individuare le alterazioni motorie indotte dal trattamento con MPTP sono stati eseguiti test comportamentali quali il Paw Grip Endurance Test (*PaGE test*), il test per l'attività motoria in campo aperto (*Open field*).

*Open Field*. Ciascun animale viene posto in un box, costituito da pareti trasparenti, di dimensione 80 cm x 80 cm x 10 cm. Il pavimento del box viene suddiviso in quadrati di 10 cm per lato. Dopo un minuto di ambientazione vengono contati il numero di quadrati che l'animale percorre in 2 minuti. In questo modo si riesce a valutare se l'animale

trattato con MPTP presenta una qualche compromissione motoria che impedisce la normale esplorazione dell'ambiente.

*Paw Grip Endurance test (PaGE-test)*. Ciascun animale viene posto sopra una grata di ferro che successivamente viene capovolta dallo sperimentatore dopo essersi assicurato che l'animale si sia aggrappato. Viene quindi misurato il tempo in cui ciascun topo riesce a rimanere aggrappato alla grata prima di cadere. Il test della durata massima di 30 minuti viene ripetuto per tre volte e il risultato espresso in minuti. La media tra queste tre misurazioni ha fornito il dato finale relativo a ciascun animale. Si riesce così a valutare indirettamente la forza muscolare sviluppata dagli arti del topo.

## **7.4. INDAGINI MORFOLOGICHE**

Una settimana dalla fine dell'ultima iniezione gli animali sono stati sacrificati per mezzo di anestesia profonda con cloralio idrato e successivamente toracotomizzati e perfusi mediante pompa peristaltica con soluzione salina (50 ml) seguita da paraformaldeide al 4% in n tampone fosfato 0,1 M (200 ml). Gli animali così processati sono stati utilizzati per l'indagine morfologica in microscopia ottica e elettronica.

### **7.4.1. MICROSCOPIA OTTICA**

Dagli animali perfusi sono stati prelevati l'encefalo e l'apparato digerente. Dell'apparato digerente sono stati prelevati campioni di esofago, stomaco, duodeno, ileo e colon che sono stati accuratamente lavati con soluzione salina (0.9%) per rimuovere residui del processo digestivo. I campioni sono stati mantenuti in paraformaldeide al 4% per 24 ore a 4 °C. Nel nostro studio portiamo solo i dati che abbiamo osservati nel duodeno.

Il protocollo di inclusione ha previsto, dopo diversi lavaggi in tampone fosfato, l'immersione dei campioni in soluzioni di alcool etilico a concentrazioni progressivamente crescenti (Et 70°, Et 80°, Et 96° e Et 100°) al fine di permettere la disidratazione del tessuto. Infine, è stato effettuato un passaggio in xilolo per chiarificare e favorire la penetrazione della paraffina (Merck, temperatura di fusione 56-58°C) nella quale, al termine della procedura, sono stati immersi i campioni. Trascorse

4 ore in stufa a 56-58°C, i campioni sono stati montati in paraffina ottenendo così i blocchetti solidi utilizzabili per il taglio al microtomo.

Sezioni di 7 µm di spessore ottenute da ciascun campione sono state montate su vetrini polilisinati seguendo uno stretto ordine anatomico e utilizzate per l'analisi morfologica e immunoistochimica così come descritto nel dettaglio nei paragrafi successivi.

#### **7.4.1.1. Colorazione con Ematossilina e Eosina**

Le sezioni del duodeno vengono colorati con ematossilina e eosina (H&E) per valutare la morfologia del campione ed eventuali modificazioni della struttura.

Le sezioni sono state deparaffinizzate per 40 minuti in xilolo e sottoposte a concentrazioni decrescenti di alcool per 10 minuti ciascuno (100%, 96%, 70%). Le sezioni sono state lavate in acqua distillata per 10 minuti e immerse per 15 minuti in emalume e per 30 secondi in eosina. Dopo disidratazione in alcool e chiarificazione in xilolo, le sezioni sono state montate usando il montante DPX (Fluka Analytical, GmbH, Germania).

Le sezioni colorate con H&E sono state utilizzate per valutare la presenza di alterazioni morfologiche.

#### **7.4.1.2. Immunoistochimica**

Sono stati utilizzati anticorpi monoclonali anti tirosina idrossilasi (TH) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e anti  $\alpha$ -sinucleina (BD Transduction, Buccinasco, Milano, Italia) per le sezioni dello striato e la SNpc: entrambi gli anticorpi sono stati diluiti 1:1000. Per il duodeno gli anticorpi anti-TH e anti  $\alpha$ -sinucleina sono stati diluiti rispettivamente 1:100 e 1:250.

Le sezioni di encefalo, in corrispondenza di striato e *substantia nigra*, e duodeno, sono state deparaffinizzate mediante passaggi in xilolo per 40 minuti e idratate in passaggi successivi utilizzando concentrazioni decrescenti di alcool per 10 minuti ciascuno. Successivamente le sezioni sono state permeabilizzate con Triton (Sigma Aldrich) allo 0,1%, incubate con una soluzione di siero bloccante (normal goat serum 10%, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) in TBS (soluzione composta da NaCl 5M e Tris



HCl 1M), per 1 ora a temperatura ambiente e alla fine incubate con gli anticorpi primari:  $\alpha$ -sinucleina o TH per 24 ore a 4°C.

Il giorno seguente, dopo accurati lavaggi in TBS, le sezioni sono state incubate per 1 ora e mezzo a temperatura ambiente con i corrispondenti anticorpi secondari biotinilati (Vector Laboratories, USA) alla diluizione di 1:200 per 1 ora a temperatura ambiente, la reazione viene rivelata con diaminobenzidina (DAB; Sigma Aldright, St.Louis, USA). Alcune sezioni sono state contro colorate debolmente con emallume. Quindi le sezioni sono state disidratate con una serie crescente di alcool per 10 minuti ciascuno, chiarificati in xilolo per 10 minuti e montati con il montante DPX (Fluka). Le sezioni sono state osservate al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i light (Giappone).

#### **7.4.2. MICROSCOPIA ELETTRONICA**

Il duodeno è stato prelevato rapidamente e mantenuto in una soluzione di paraformaldeide al 2% e glutaraldeide 0,1% per 1 ora e 30 min.

Successivamente il tessuto è stato post-fissato in tetrossido di osmio (Electron Microscope Sciences, Hatfield, PA, USA) all'1% per due ore a 4°C, disidratato in alcool etilico e incluso in resina epossidica Epon-araldite (Fluka-Sigma, Svizzera). Le sezioni ultrafini sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo ed esaminate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) Jeol Jem 100SX (Japan).

##### **7.4.2.1. Immunocitochimica**

Per la microscopia elettronica sono state eseguite tecniche di post-embedding. Abbiamo effettuato l'immunocitochimica per la presenza dell'anti  $\alpha$ -sinucleina nel duodeno. Le sezioni ultrafini deosmicate mediante soluzione acquosa di sodio-medioperiodato, sono state incubate prima in PBS contenente goat-serum al 10% e saponina allo 0,2% per 20 minuti, per bloccare i siti antigenici aspecifici e favorire la penetrazione dell'anticorpo, e poi nelle soluzioni di anticorpo primario per  $\alpha$ -sinucleina diluito (1:10) in PBS contenente goat-serum all'1% e saponina allo 0,2% per 24 ore a 4°C. Quindi, le fettine sono state incubate per 1 ora con anticorpo secondario coniugato a particelle d'oro a 20 nm diluiti (1:30) in soluzioni analoghe a quelle usate per l'incubazione con anticorpi primari. Infine sono state brevemente fissate con

glutaraldeide all'1% e contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo e osservate al microscopio elettronico a trasmissione (*Jeol Jem 100SX*).

#### **7.4.3. IMMUNOBLOTTING**

Per le analisi biochimiche gli animali sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale. I campioni di striato, *substantia nigra* e duodeno sono stati lavati con PBS e successivamente lisati con RIPA buffer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA) più l'aggiunta di un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma). La concentrazione proteica è stata valutata utilizzando il metodo *Lowry* (kit Micro Lowry, Peterson's modification; Sigma). Per ogni campione è stata utilizzata un'uguale quantità di proteine, alla quale è stato aggiunto *Laemmli buffer*; dopo di che i campioni sono stati portati alla temperatura di 100°C per 5 minuti e caricati su un gel di poliacrilammide al 12%. Le proteine sono state trasferite dal gel di poliacrilamide su una membrana di PVDF ECL Hybond (GE Healthcare). Dopo il trasferimento, le membrane sono state bloccate con albumina al 5% in PBS-Tween 0,05% per 1 ore a temperatura ambiente, e successivamente incubate con l'anticorpo primario per la TH o per l' $\alpha$ -sinucleina (diluito 1:1000 e 1:300 rispettivamente, in PBS-Tween contenente albumina all'1%), per 2 ore a temperatura ambiente su di un agitatore. Alla fine dell'incubazione con l'anticorpo primario le membrane sono state incubate con il corrispondente anticorpo secondario (1:2000 e 1:600 rispettivamente) legato alla perossidasi (HRP coniugato) (GEhealthcare) alla concentrazione di 1:2000 per la TH e 1:600 per  $\alpha$ -sinucleina, per 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane vengono infine processate utilizzando ECL plus *western blot* detection reagents (GE Healthcare) e lo sviluppo in chemiluminescenza è effettuato su lastre fotografiche Amersham Hyperfilm ECL (GEhealthcare).

## 8. RISULTATI

### **La somministrazione di MPTP nel topo induce una ridotta performance motoria al PaGE test**

La tossina MPTP ha indotto un peggioramento nella performance motoria dei topi trattati. Come si può osservare dalla figura 1, il trattamento non ha alterato la capacità dell'animale di esplorare l'ambiente circostante, misurato come numero di quadrati percorsi in 2 minuti, risultando paragonabile al controllo (**Figura 1-A**). Il test più sensibile è risultato il PaGE test, in quanto, fin dalla prima osservazione, si può notare negli animali trattati una significativa riduzione della capacità di rimanere in posizione sulla griglia capovolta (**Figura 1-B**).

### **La somministrazione di MPTP nel topo induce degenerazione dei neuroni dopaminergici nello striato e nella *substantia nigra***

La perdita dei neuroni dopaminergici nigrali che proiettano allo striato dorsale rappresenta un effetto noto dell'MPTP, alla base del suo impiego sperimentale come neurotossina parkinsonigena. Nel nostro studio, l'analisi dell'espressione della tirosina idrossilasi (TH), l'enzima limitante la sintesi delle catecolamine, che rappresenta un tipico marker dopaminergico, conferma l'effetto tossico del trattamento con MPTP per il sistema dopaminergico nigrostriatale. Infatti, gli animali trattati con MPTP hanno mostrato un'evidente riduzione dell'immunopositività per la TH sia nello striato (**Figura 2**) che nella *substantia nigra* (**Figura 3**). In particolare, mentre la riduzione di immunopositività per la TH nello striato è dovuta alla degenerazione dei terminali dopaminergici, la perdita di immunopositività per la TH nella *substantia nigra* è da ascrivere alla perdita dei corpi cellulari dei neuroni dopaminergici che proiettano allo striato.

L'*immunoblotting* per la TH conferma la riduzione dell'espressione della proteina sia nello striato che nella *substantia nigra* (**Figure 2 e 3**, rispettivamente).

## **La somministrazione di MPTP nel topo induce l'espressione di $\alpha$ -sinucleina nel sistema dopaminergico nigrostriatale**

L' $\alpha$ -sinucleina è una proteina che tende a formare fibrille insolubili che precipitano sotto forma di aggregati i quali non vengono efficacemente rimossi dai fisiologici sistemi di *clearance*. In molte malattie neurodegenerative, dette sinucleinopatie, come la Malattia di Parkinson, le inclusioni  $\alpha$ -sinucleina-positive rappresentano un tipico reperto anatomico-patologico. Nei topi di controllo l'immunopositività per l' $\alpha$ -sinucleina a livello dei neuroni dopaminergici nigrali risulta virtualmente assente (**Figura 4**). La somministrazione cronica di MPTP ha prodotto, nel nostro modello sperimentale, un incremento di immunopositività per l' $\alpha$ -sinucleina specificamente all'interno dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra*, i cui corpi cellulari appaiono intensamente marcati (**Figura 4**).

L'*immunoblotting* per la proteina conferma l'incremento di  $\alpha$ -sinucleina nella *substantia nigra* indotto dal trattamento con MPTP (**Figura 4**).

## **La somministrazione di MPTP nel topo induce alterazioni morfologiche nella parete del duodeno**

L'analisi della parete del duodeno dopo somministrazione di MPTP ha rivelato la comparsa di alterazioni strutturali e ultrastrutturali. In particolare, la colorazione con E&E di sezioni di duodeno mostra una marcata alterazione nell'architettura tissutale (**Figura 5**). Infatti, il trattamento con MPTP riduce sensibilmente lo spessore della tonaca mucosa, come evidenziato dalla generale riduzione dell'altezza dei villi (**Figure 6 e 7**) e della lunghezza delle ghiandole intestinali di Lieberkhün (**Figura 8**) negli animali trattati rispetto ai controlli. In particolare, negli animali trattati con MPTP l'architettura generale dei villi appare scompaginata (**Figura 7**), mentre le cellule caliciformi mucipare sono molto ben evidenti a causa di un abbondante accumulo di muco nella loro parte apicale, che risulta pertanto molto dilatata (**Figura 8**). Inoltre, nella tonaca sottomucosa dei topi trattati con MPTP si nota la tendenza a un marcato addensamento dei corpi ghiandolari (**Figura 9**).

## **La somministrazione di MPTP riduce l'espressione della TH nell'intestino di topo**

In linea con quanto osservato nel SNC, anche a livello periferico il trattamento con MPTP riduce l'espressione della TH (**Figura 10**). In particolare, l'immunopositività per la TH nei topi di controllo è evidente in specifiche cellule contenute nelle ghiandole (cellule enterocromaffini) e all'interno della lamina propria, e a livello di fibre nervose che decorrono nell'asse del villo e nella tonaca sottomucosa (**Figure 11 e 12**). Il trattamento con MPTP riduce sensibilmente l'immunopositività alla TH sia nel villo che nelle ghiandole (**Figure 11 e 12**). L'*immunoblotting* conferma che l'espressione della TH nel duodeno dei topi dopo trattamento con MPTP è significativamente ridotta rispetto ai controlli, come dimostrato dall'analisi densitometrica semiquantitativa (**Figura 13**).

## **Il trattamento con MPTP induce l'espressione dell' $\alpha$ -sinucleina nell'intestino di topo**

L'immunoistochimica per la proteina  $\alpha$ -sinucleina condotta nel duodeno di topo dimostra che il trattamento con MPTP è in grado di aumentare l'immunopositività per l' $\alpha$ -sinucleina (**Figura 14**). Nel topo di controllo una debole immunopositività per l' $\alpha$ -sinucleina appare interessare scarse fibre nervose decorrenti nella lamina propria (**Figure 15 e 16**); nella tonaca sottomucosa, l'immunopositività per l' $\alpha$ -sinucleina appare localizzata in alcune cellule ghiandolari (**Figura 17**). Nel topo trattato con MPTP l'immunopositività per l' $\alpha$ -sinucleina appare visibilmente più intensa (**Figure 15 e 16**). In particolare, all'interno dell'asse del villo un'intensa positività all' $\alpha$ -sinucleina interessa alcune cellule e fibre nervose (**Figura 16**); fibre positive per l' $\alpha$ -sinucleina appaiono inoltre nella tonaca sottomucosa, decorrenti nel connettivo interstiziale disposto tra i corpi ghiandolari addensati, mentre le cellule ghiandolari risultano molto meno marcate rispetto a quelle degli animali di controllo (**Figura 17**).

L'*immunoblotting* per l' $\alpha$ -sinucleina con relativa analisi densitometrica ha fornito una misura semiquantitativa dell'induzione di  $\alpha$ -sinucleina da parte dell'MPTP nel duodeno di topo (**Figura 18**).

## **Il trattamento con MPTP causa cambiamenti ultrastrutturali e induce l'espressione di $\alpha$ -sinucleina nel duodeno di topo**

Le sezioni semifini del duodeno di topo confermano che il trattamento con MPTP è in grado di produrre profonde alterazioni a carico dell'epitelio di rivestimento e della lamina propria che forma l'asse del villo (**Figura 19**). Inoltre, l'analisi al microscopio elettronico a trasmissione della marcatura per l' $\alpha$ -sinucleina rivela la presenza di particelle di immunogold all'interno dell'asse del villo degli animali trattati cronicamente con MPTP, in cellule con citoplasma rarefatto e nucleo con cromatina condensata (dati non mostrati).

## 9. DISCUSSIONE

I dati ottenuti indicano che nei topi il trattamento con MPTP produce alterazioni del tratto GI, similmente a quanto descritto nei pazienti affetti da MdP. Infatti, a livello morfologico si evidenzia sia a livello centrale che nel duodeno una perdita dei neuroni TH-positivi e un aumento della positività per l' $\alpha$ -sinucleina, e questi dati rafforzano anche risultati ottenuti mediante i test motori, mostrando un coinvolgimento del SNC.

Questi risultati permettono di confermare la validità del topo trattato con MPTP come modello per lo studio della MdP, in quanto vengono replicati i disturbi gastrointestinali che si verificano in pazienti parkinsoniani.

Studi *post mortem* e biotici condotti su pazienti parkinsoniani (Edwards, 1992; Singaram *et al.*, 1995; Lebouvier *et al.*, 2008) suggeriscono che la perdita della TH osservata a livello intestinale è correlata ad una morte selettiva dei neuroni DAergici.

La degenerazione dei neuroni DAergici del SNE è stata osservata alle stesse dosi di MPTP che producono un danno alla via nigro-striatale.

Nonostante l'alta prevalenza di disturbi gastrointestinali nei pazienti affetti da MdP, la mancanza di un modello sperimentale in grado di mimare con la massima fedeltà questo tipo di disfunzioni non permette di chiarire se a livello gastrointestinale si verifichi nella MdP una reale perdita cellulare e se questa avvenga specificatamente per una sottoclasse di neuroni del sistema nervoso periferico.

Un recente studio ha esaminato le alterazioni avvenute nel tratto GI nel ratto in seguito alla somministrazione cronica di rotenone; negli animali trattati si è osservata un'inibizione del complesso mitocondriale I (Drolet *et al.*, 2009), in maniera analoga agli effetti determinati dalla MPTP.

Gli studi sperimentali che usano modelli animali per indagare le disfunzioni del tratto GI nella MdP sono pochi, e questo comporta una limitazione nella comprensione e nel trattamento di questi sintomi.

Poiché la MdP non è naturalmente presente nelle specie animali devono essere sviluppati artificialmente adeguati modelli sperimentali.

Gli effetti della MPTP nel tratto GI dei roditori sono stati trattati in diversi studi (Szabo *et al.*, 1985) i quali mostrano nel ratto una diminuzione della secrezione gastrica e pancreatica e, a livello duodenale, ulcerazioni e un'inibizione dell'attività degli *spike*.

Eaker *et al.* nel 1987 hanno osservato un'interruzione del complesso migrante mioelettrico nel duodeno di ratto attraverso il SNE ma nessun effetto a livello del SNC. Questi effetti gastrointestinali si sono verificati dopo la somministrazione di una dose moderata (30 mg/kg) di MPTP, mentre la diminuzione della DA è stata individuata con una somministrazione di 180 mg/kg di MPTP. Si è visto che i ratti non sono un modello ideale per la somministrazione di MPTP: infatti, nel ratto solo dosi molto elevate (letali) di MPTP devono essere somministrate *in vivo* per ottenere un danno a livello nigro-striatale, mentre la tossicità a livello periferico si verifica già a basse dosi, quando il SNC non è ancora coinvolto.

Il topo è un modello sperimentale più appropriato del ratto per imitare i sintomi della MdP dopo l'iniezione di MPTP. A tale riguardo, è stata riportata un'inibizione acuta di motilità gastrointestinale nei topi, misurata dal passaggio di carbone (Haskel e Hanani, 1994). Questo effetto è stato attribuito ai cambiamenti dell'epinefrina e della DA. Analogamente, in uno studio *in vitro*, (Hanani, 1990) è stato osservato un rilassamento muscolare nel colon del topo. Tuttavia, nonostante il loro contributo significativo, tutti questi effetti sono stati misurati immediatamente dopo l'esposizione all'MPTP mentre la degenerazione cellulare non risulta ancora prodotta.

Pertanto, gli effetti molto probabilmente dipendono da un rilascio acuto di NA e dall'esaurimento di questa a livello delle terminazioni nervose periferiche.

Infatti, la neurotossina provoca un acuto e non specifico rilascio di catecolamine a livello centrale e a livello periferico (Pileblad e Carlsson, 1988) che è seguito da un danno stabile dopo alcuni giorni. Il rilascio di neurotrasmettitore indotto dall'MPTP, che si verifica al livello periferico immediatamente dopo l'iniezione, non è correlato al danno (Giovanni *et al.*, 1994, b; Fornai *et al.*, 1997)

Uno studio interessante condotto da Anderson *et al.* (2007) sul topo ha mostrato una perdita del 40% di neuroni TH-positivi all'interno dei plessi intestinali accompagnata da un'alterazione nella motilità intestinale dopo dieci giorni dal trattamento con una dose di 60 mg/kg di MPTP.

La principale critica posta al modello della MPTP è rivolta al fatto che la MPTP non è in grado di replicare il decorso e la topografia anatomica della MdP, in cui le manifestazioni cliniche non-DAergiche si associano con sintomi non-motori (Braak *et al.*, 2003). I dati presenti, insieme ai precedenti risultati ottenuti in altri organi periferici,



confermano la capacità del modello sperimentale trattato con la MPTP di riprodurre in modo affidabile anche le alterazioni che si verificano a livello periferico nella MdP. I nostri risultati sono in linea con lo studio di Goetze e Woitalla del 2008, che raccomandano l'uso di MPTP in studi sperimentali volti ad analizzare l'attività del tratto GI nella MdP. Questi dati, insieme allo studio di Drolet *et al.* (2009), indicano che gli inibitori del complesso mitocondriale I sono opportune neurotossine da usare per lo studio delle funzioni del tratto GI nei ratti trattati con rotenone e nei topi trattati con MPTP. In effetti, in questo studio l'MPTP riproduce la maggior parte delle alterazioni morfologiche, funzionali e biochimiche riscontrabili nel tratto digestivo dei pazienti con MdP.

Nel nostro studio, l'analisi morfologica dimostra che la somministrazione di MPTP causa neurodegenerazione nel SNE, sia nel plesso mioenterico che in quello della sottomucosa, osservata tramite indagini immunologiche e istologiche per la TH nei neuroni enterici. Infatti, abbiamo trovato tramite le tecniche di *immunoblotting*, di immunistochimica e di immunocitochimica un aumento dell' $\alpha$ -sinucleina nel duodeno dei topi trattati con MPTP. I risultati ottenuti confermano ciò che è stato trovato da Drolet *et al.* nel 2009 che hanno esplorato soprattutto il plesso mioenterico. In questo studio è stato evidenziato un danno dei neuroni DAergici sia nel plesso mioenterico che in quello della sottomucosa.

Studi precedenti hanno osservato la presenza di neuroni DAergici nel SNE e in particolare nel plesso mioenterico, andando a costituire una rete neurale intrinseca (Anlauf *et al.*, 2003; Cersosimo e Benarroch, 2008). Così come nei topi, biopsie effettuate su tessuti umani evidenziano che nel SNE alcuni neuroni sono DAergici (Lebouvier *et al.*, 2008).

La scoperta di un accumulo di  $\alpha$ -sinucleina nel plesso mioenterico e in quello sottomucoso (Kupsky, 1987; Ohama e Ikuta, 1976; Wakabayashi *et al.*, 1988) e la perdita di neuroni DAergici nel plesso mioenterico (Edwards, 1992; Singaram *et al.*, 1995) nei pazienti parkinsoniani suggerisce che la MdP possa iniziare come una patologia degenerativa del tratto GI, la quale può essere dovuta a un processo analogo a quello descritto nel SNC. Sulla base di questi dati, Phillips *et al.* (2008) hanno ipotizzato che la MdP possa iniziare nell'intestino per poi essere trasportata attraverso il nervo vago nel tronco encefalico.

Sebbene questi punti debbano essere ampliati con una serie di indagini, vale la pena ricordare che in un recente studio biopsie del plesso della sottomucosa del colon di pazienti che lamentavano una costipazione funzionale hanno mostrato una più alta immupositività all' $\alpha$ -sinucleina (Lebouvier *et al.*, 2008). In linea con questi risultati e confermando i dati ottenuti nei ratti trattati cronicamente con rotenone, nel presente studio abbiamo osservato l'aumento dell' $\alpha$ -sinucleina dopo l'immunocolorazione del duodeno di topi trattati con MPTP.

È interessante sottolineare che nei topi che sovraesprimono l' $\alpha$ -sinucleina l'attività motoria propulsiva enterica risulta ridotta (Wang *et al.*, 2008). In accordo con questo, i topi che esprimono  $\alpha$ -sinucleina mutante sviluppano anomalie nella funzione del SNE, similmente a quello che si osserva per i deficit gastrointestinali nella MdP nell'uomo (Kuo *et al.*, 2010).

## 10. CONCLUSIONI

In conclusione, questi dati suggeriscono che l'MPTP riduca nel duodeno di topo la quantità di neuroni enterici TH-positivi agendo selettivamente sui neuroni DAergici sia nel plesso mioenterico che nel plesso della sottomucosa.

In maniera analoga alla MdP, in questi topi abbiamo trovato un accumulo di  $\alpha$ -sinucleina. Queste caratteristiche sono molto simili alle disfunzioni del tratto GI nei pazienti con MdP fornendo un approccio anatomico per comprendere la disfunzione del tratto GI e indagare nuovi agenti farmacologici in grado di curare/prevenire i sintomi GI nei pazienti con MdP.

Inoltre queste osservazioni potrebbero fornire una base per l'uso delle biopsie intestinali come diagnosi della MdP.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbott RD, Petrovitch H, White LR, Masaki KH, Tanner CM, Curb JD, *et al.* Frequensy of bowel moviments and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 2001; **57**: 456-462.
- Abbott RA, Cox M, Markus H, Tomkins A. Diet, body size and micronutrient status in Parkinson's disease. *Eur J Clin Nutr* 1992; **46**: 879-84.
- Albin RL, Young AB, Penny JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989; **12**: 366-375.
- Ali GN, Wallace KL, Schawrtz R, deCarle DJ, Zagami AS, Cook IJ. Mechanisms of oral-pharyngeal dysphagia in patients with parkinson's disease. *Gastroenterology* 1996; **110**: 383-92.
- Armstrong RA. Parkinson's disease and the eye. *Ophthalmic Physiol Opt* 1997; **17** (suppl): S9-S16.
- Anderson G, Noorian AR, Taylor G, Anitha M, Bernhard D, Srinivasan S, Greene JG. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp neurol.* 2007; **207**: 4-12.
- Amino T, Orimo S, Itoh Y, Takahashi A, Uchihara T, Mizusawa H. Profound cardiac sympathetic denervation occurs in Parkinson disease. *Brain Pathol.* 2005;**15**:29-34.
- Ashraf W, Wszolek ZK, Pfeiffer RF, Normand M, Maurer K, Srb F, Edwards LL, Quigley EM. Anorectal function in fluctuating (on-off) Parkinson's disease: evaluation by combined anorectal manometry and electromyography. *Mov Disord.* 1995 Sep; **10**(5): 650-7.
- Arbouw ME, Movig KL, Koopmann M, *et al.*: Glycopyrrolate for sialorrhea in Parkinson disease: a randomized, double-blind, crossover trial. *Neurology* 2010; **74**: 1203-7. This provides level I evidence for glycopyrrolate to treat sialorrhea in PD
- Ashraf W, Wszolek zk, Pfeiffer RF, Normand M, Maurer K, Srb F, *et.al.* Anorectal function in fluctuating (on-off) Parkinson's disease: evaluation by combined anorectal manometry and electromyography. *Mov Disord.* 1995; **10**: 650-7.
- Ashraf W, Pfeiffer RF, Park F, Lof J, Quigley EMM. Constipation in Parkinson's disease: objective assessment and response to psyllium. *Mov Disord* 1997; **12**: 946-951.
- Baba Y, Kuroiwa A, Uitti RJ, Wszolek ZK, Yamada T. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005; **11**: 493-498.
- Bagheri H, Damase-Michel C, Lapeyre-Mestre M, Cismondo S, O'Connell D, Senard JM, Rascol O, Montastruc JL. A study of salivary secretion in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol.* 1999; **22**: 213-5.
- Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology.* 2000 Nov 14;**55**(9):1358-63.

- Ballard PA, Tetrad JW, Langston JW .Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* 1985; **35**:949-956.
- Bassotti G, Germane U, Pagliaricci S, Pleas A, Giulietti O, Mannarino E, Morelli A. Oesophageal manometric abnormalities in Parkinson's disease. *Dysphagia* 1998; **13**: 28-31.
- Bassotti G, Maggio D, Battaglia E, Giulietti O, Spinozzi F, Reboldi G *et.al*. Manometric investigation on anorectal function in early and late stage Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; **68**: 768-70.
- Bateson MC, Gibberd Fb, Wilson RSE. Salivary symptoms in Parkinson disease. *Arch neurol* 1973; **29**: 274-75.
- Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat rev neurosci* 2001; **2**: 325-34.
- Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathologica* 2010; **119**(6): 689-702.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuma M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduced features of Parkinson's disease. *Nat neurosci* 2000; **3**:1300-1306.
- Betarbet R, Sherer TB, Lund S, Greenamyre JT Rotenone Models of Parkinson's Disease: Altered Proteasomal Activity Following Sustained Inhibition of Complex I. Abstr.-Soc. *Neurosci.* 2003 vol. 28.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 2002 Apr; **24**(4): 308-18.
- Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, et al. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain* 2001; **124**: 2131-46.
- Bezard E, Crossman AR, Gross CE, Brotchie JM. Structures outside the basal ganglia may compensate for dopamine loss in the presymptomatic stages of Parkinson's disease. *FASEB J.* 2001 Apr; **15**(6): 1092-4.
- Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2006; **32**(3): 284-95.
- Bodis-Wollner I. Visual electrophysiology in Parkinson's disease: PERG, VEP and visual P300. *Clin Electroencephalogr.* 1997 Jul; **28**(3): 143-7.
- Bozeman T, Anuras S, Hutton T, Mikeska C. Small intestinal manometry in Parkinson's disease. *Gastroenterology* 1990; **99**: 1202.
- Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neuronal Transm.* 2003; **110**: 517-36.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; **24**: 197-211.
- Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta neuropathologica* 2007; **113**(4): 421-9.

- Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006; **396**: 67–72.
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, de Vos RA, Jansen EN. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.*1995; **46**: 15-31.
- Braak H, Del Tredici K. Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered. *Exp Neurol.* 2008 Jul; **212**(1): 226-9.
- Brandies R, Yehuda S. The possible role of retinal dopaminergic system in visual performance. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; **32**: 611–656.
- Brissaud E. 1925. *Lecçons sur les maladies nerveuses.* Masson, Paris.
- Bodis-Wollner I. Visual electrophysiology in Parkinson's disease: PERG, VEP and visual P300. *Clin Electroencephalogr* 1997; **28**: 143–147.
- Bjorklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 2007; **30**: 194–202.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O. The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin Wochenschr* 1961; **73**: 787–8.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O. The effect of L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) on akinesia in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 1998; **4**: 59–60.
- Byrne KG, Pfeiffer R, Quigley EM. Gastrointestinal dysfunction in parkinson's disease. A report of clinical experience at a single center. *J Clin Gastroenterol* 1994; **19**: 11-6.
- Campos-Sousa RN, Quagliato E, da Silva BB, De Carvalho RM, Jr, Ribeiro SC, de Carvalho DF. Urinary symptoms in Parkinson's disease: prevalence and associated factors. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003; **61**: 359–363.
- Calne DB, Langston JW. Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet.* 1983 Dec 24-31; **2**(8365-66): 1457-9
- Caplan LH, Jacobson HG, Rubinstein BM, Rotman MZ. Megacolon and volvulus in Parkinson's disease. *Radiology* 1965; **85**: 73-9.
- Castell JA, Jonston BT, Colcher A, Li Q, Gideon RM, Castell DO. Manometric abnormalities of the oesophagus in patients with Parkinson's disease. *Neurogastroenterol motil* 2001; **13**: 361-4.
- Cersosimo MG, Benarroch EE. Neural control of the gastrointestinal tract: implications for Parkinson disease. *Mov Disord.* 2008; **23**: 1065-75.
- Chaudhuri KR, Yates L, Martinez-Martin P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005; **5**: 275-83.
- Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2008; **167**: 90–95.
- Chaudhuri KR, Martinez-Martin P, Schapira AH, Stocchi F, Sethi K, Odin P *et al.* International multicenter pilot study of the first comprehensive self-completed nonmotor symptoms questionnaire for Parkinson's disease: the NMSQuest study. *Mov Disord.* 2006; **21**: 916-23.
- Charcot J-M. 1872. De la paralysie agitante. In *Oeuvres Complètes (t 1) Lecçons sur les maladies du système nerveux*, pp. 155–188. A Delahaye, Paris. [In English: Charcot J-M. 1877. On Parkinson's disease. In *Lectures on diseases of the*

- nervous system delivered at the Salpêtrière (transl. Sigerson G), pp. 129–156. *New Sydenham Society*, London.
- Chiocchetti R, Mazzuoli G, Albanese V et al. Anatomical evidence for ileal Peyer's patches innervation by enteric nervous system: a potential route for prion neuroinvasion? *Cell Tissue Res*. 2008; **332**: 185–94.
- Clarke CE, Gullaksen E, Macdonald S, Lowe F. Referral criteria for speech and language therapy assessment of dysphagia caused by idiopathic Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 1998; **97**: 27–35.
- Cushman M, Johnson BS, King OD, Gitler AD, Shorter J. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *J Cell Sci* 2010; **123**: 1191–201.
- Crowe R, Kamm MA, Burnstock G, Lennard-Jones JE. Peptide-containing neurons in different regions of the submucous plexus of human sigmoid colon. *Gastroenterology* 1992; **102**: 461–7.
- Crowell MD. Pathogenesis of slow transit and pelvic floor dysfunction: from bench to bedside. *Rev Gastroenterol Disord*. 2004; **4**(Suppl 2): S17–27.
- Crossman AR Neural mechanisms in disorders of movement. *Comp Biochem Physiol, Part A: Mol Integr Physiol*. 1989; **93**: 141–149.
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N Jr. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; **120**: 574–578.
- Dabby R, Djaldetti R, Shahmurov M, Treves TA, Gabai B, Melamed E, Sadeh M, Avinoach I. Skin biopsy for assessment of autonomic denervation in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2006; **113**: 1169–1176.
- Dawson T, Mandir A, Lee M Animal models of PD: pieces of the same puzzle? *Neuron*. 2002; **35**: 219–222.
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1989; **52**(2): 381–9.
- Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, Bruley des Varannes S, Neunlist M, De Giorgio R. Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. *Neurology*. 2011; **77**(19): 1761–7.
- De Keyser J, De Backer JP, Wilczak H, Herroelen L. Dopamine agonists used in the treatment of Parkinson's disease and their selectivity for the D1, D2, and D3 dopamine receptors in human striatum. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1995; **19**: 1147–54.
- DeLong, M.R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*. 1990; **13**: 281–285.
- De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000; **54**(11 Suppl5): S21–3.
- De Marinis M, Stocchi F, Gregori B, Accornero N. Sympathetic skin response and cardiovascular autonomic function tests in Parkinson's disease and multiple system atrophy with autonomic failure. *Mov Disord*. 2000; **15**: 1215–1220.
- Djaldetti R, Melamed E. Management of response fluctuations: practical guidelines. *Neurology*. 1998; **51**: 36–40.

- Djaldetti R, Lev N, Melamed E. Lesions outside the CNS in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2009 Apr 30; **24**(6): 793-800.
- Djaldetti R, Melamed E. Levodopa ethylester: a novel rescue therapy for response fluctuations in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1996 Mar; **39**(3): 400-4.
- Di Monte DA. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol.* 2003; **2**: 531– 538.
- Drolet RE, Cannon JR, Montero L, Greenamyre JT. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. *Neurobiol Dis.* 2009 Oct; **36**(1): 96-102.
- Durrieu G, Llau ME, Rascol O, Senard JM, Rascol A, Montastruc JL. Parkinson's disease and weight loss: a study with anthropometric and nutritional assessment. *Clin Auton Res.* 1992; **2**: 153-7.
- Eadie MJ, Tyrer JH. Alimentary disorder in parkinsonism. *Australas Ann Med.* 1965; **14**: 13-22.
- Eaker EY, Bixler GB, Dunn AJ, Moreshead WV, Mathias JR. Chronic alterations in jejunal myoelectric activity in rats due to MPTP. *Am J Physiol.* 1987; **253**: 809-15.
- Eaker EY, Bixler GB, Dunn AJ, Moreshead WV, Mathias JR. Dopamine and norepinephrine in the gastrointestinal tract of mice and the effects of neurotoxins. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; **244**: 438-42.
- Edwards LL, Pfeiffer RF, Quigley EM, Hofman R, Balluff M. Gastrointestinal symptoms in parkinson's disease. *Mov Disord.* 1991; **6**: 151-6.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. *Klin. Wochenschr.* 1960; **38**: 1236.
- Fasano A, Ricciardi L, Lena F, Bentivoglio AR, Modugno N. Intrajejunal levodopa infusion in advanced Parkinson's disease: long-term effects on motor and non-motor symptoms and impact on patient's and caregiver's quality of life. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 Jan; **16**(1): 79-89.
- Friedman A, Potulska A. Botulinum toxin for treatment of parkinsonian sialorrhea. *Neurol Neurochir Pol.* 2001; **35** Suppl 3:23-7
- Fornai F, Lenzi P, Gesi M, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL et al. Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci.* 2003; **23**: 8955-66.
- Fornai F, Ruffoli R, Soldani P, Ruggieri S, Paparelli A. The "Parkinsonian heart" from novel vistas to advanced therapeutic approaches in Parkinson's disease. *Curr Med Chem.* 2007; **14**: 2421-8.
- Foix MC, Nicolesco J. 1925. Les noyaux gris centraux et la région mésencéphalo-sous-optique. Masson, Paris.
- Furness JB. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Auton Neurosci.* 2006; **130**: 1–5.
- Fumimura Y, Ikemura M, Saito Y, et al. Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in Lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; **66**: 354–362.
- Fukayo S, Nonaka K, Shimizu T, Yano E. Oral health of patients with Parkinson's disease: factors related to their better dental status. *Tohoku J Exp Med* 2003; **201**: 171-9.



- Fujishiro H, Frigerio R, Burnett M, Klos KJ, Josephs KA, Delledonne A, *et al.* Cardiac sympathetic denervation correlates with clinical and pathologic stages of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008; **23**(8): 1085–92.
- Giovanni A, Sieber BA, Heikkila RE, Sonsalla PK. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine. Part 1: systemic administration *J. Pharmacol Exp Ther.* 1994; **270**: 1000-7.
- Gray R, Stern G, Malone-Lee J. Lower urinary tract dysfunction . in Parkinson's disease: changes relate to age and not disease. *Age Ageing.* 1995; **24**: 499–504.
- Greenamyre JT. Glutamate-dopamine interactions in the basal ganglia: relationship to Parkinson's disease. *J Neural Transm Gen Sect.* 1993; **91**: 255– 269.
- Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord* 2003; **9**: 59–64.
- Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; **100**: 4078– 4083.
- Goetz CG, Lütge W, Tanner CM. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurology.* 1986; **36**: 73–75.
- Chaudhuri KR, Yates L, Martinez-Martin P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. *Current Neurology and Neuroscience Reports.* 2005; **5**(4): 275-83.
- Giasson BI, Lee VM. Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 2003; **114**: 1– 8
- Goetze O, Woitalla D. The role of MPTP in Parkinson's disease: connecting brain and gut? *Exp Neurol.* 2008; **210**: 281-5.
- Gowers WR. 1888. A manual of diseases of the nervous system. J and A Churchill, London.
- Giovanni A, Sonsalla PK, Heikkila RE. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: central administration of methyl-4-phenylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; **270**: 1008-14.
- Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2001; **2**: 492–501.
- Goldstein DS, Eldadah BA, Holmes C, Pechnik S, Moak J, Saleem A, Sharabi Y. Neurocirculatory abnormalities in Parkinson disease with orthostatic hypotension: independence from levodopa treatment. *Hypertension.* 2005; **46**: 1333–1339.
- Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; **100**: 4078– 4083.
- Guilarte TR, Chen MK, McGlothan JL, Verina T, Wong DF, Zhou Y, Alexander M, Rohde CA, Syversen T, Decamp E, Koser AJ, Fritz S, Gonczi H, Anderson DW, Schneider JS. Nigrostriatal dopamine system dysfunction and subtle motor deficits in manganese-exposed non-human primates. *Exp Neurol.* 2006 Dec; **202**(2): 381-90.
- Hagenmüller F, Classen M. Motility of Oddi's sphincter in Parkinson's disease, progressive systemic sclerosis, and achalasia. *Endoscopy.* 1998; **20**: 189-92.
- Hart MN, Cyrus A, Jr. Hyaline globules of the adrenal medulla. *Am J Clin Pathol.* 1968; **49**: 387–391.

- Hanani M. Rapid effects of MPTP in the mouse colon, *Eur J Pharmacol.* 1990; **175**: 273-7.
- Harnois C, Di Paolo T. Decreased dopamine in the retinas of C, Porciatti V. Changes in pattern electroretinograms to equiluminant red-green and blue-yellow gratings in patients with early Parkinson's disease. *J Clin Neurophysiol.* 2003; **20**: 375–381.
- Harnois C, Di Paolo T. Decreased dopamine in the retinas of patients with Parkinson's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990 Nov; **31**(11): 2473-5.
- Hardoff R, Sula M, Tamir A *et al.* Gastric emptying time and gastric motility in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2001; **16**: 1041-7.
- Hasler WL. Small intestinal motility. In Johnson LR, ed. Physiology of the Gastrointestinal tract (4<sup>th</sup> ed.) San Diego, CA: *Elsevier*. 2006: 935-64.
- Haskel Y, Hanani M, Inhibition of gastrointestinal motility by MPTP via adrenergic and dopaminergic mechanisms. *Dig Dis Sci.* 1994; **39**: 2364-7.
- Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC (1984) Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* **311**: 467-469.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: Onset, progression and mortality. *Neurology.* 1967; **17**: 427–442.
- Honig H, Antonini A, Martinez-Martin P, Forgacs I, Faye GC, Fox T, Fox K, Mancini F, Canesi M, Odin P, Chaudhuri KR. Intrajejunal levodopa infusion in Parkinson's disease: a pilot multicenter study of effects on nonmotor symptoms and quality of life. *Mov Disord.* 2009 Jul 30; **24**(10): 1468-74.
- Hornykiewicz O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 2006; **70**: 9–15.
- Hyson HC, Johnson AM, Jog MS. Sublingual atropine for sialorrhea secondary to parkinsonism: a pilot study. *Mov Disord.* 2002; **17**: 1318-20.
- Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, *et al.* A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 1993; **50**: 140–8.
- Jankovic J. Pathophysiology and assessment of parkinsonian symptoms and signs. In: Pahwa R, Lyons K, Koller WC, eds. Handbook of Parkinson's disease. New York: Taylor and Francis Group, LLC. 2007: 79–104.
- Jain S. Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011 Feb; **17**(2): 77-83.
- Jellinger K. Overview of morphological changes in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 1987; **45**: 1-18.
- Jenner P, Olanow CW. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1998 Sep; **44**(3 Suppl 1): S72-84.
- Jost WH, Jung G, Schimrigk K. Colonic transit time in non idiopathic Parkinson's syndrome. *Eur Neurol.* 1994; **34**: 329-31.
- Jost WH, Eckardt VF. Constipation in idiopathic Parkinson's disease. *Scand J Gastroenterol.* 2003; **7**: 681-6.
- Jost WH. Gastrointestinal motility problems in patients with Parkinson's disease. Effects of antiparkinsonian treatment and guidelines for management. *Drugs Aging.* 1997; **10**: 249-58.
- Jost WH. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's Disease. *J Neurol Sci.* 2010 Feb 15; **289**(1-2): 69-73.

- Jones DC, Miller GW. The effects of environmental neurotoxins on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem Pharmacol.* 2008 Sep 1; **76**(5): 569-81.
- Kalf JG, Bloem BR, Munneke M. Diurnal and nocturnal drooling in Parkinson's disease. *J Neurol.* 2012; Jan; **259**(1): 119-23.
- Kaufmann H, Nahm K, Purohit D, Wolfe D. Autonomic failure as the initial presentation of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004; **63**: 1093-1095.
- Kupsky WJ, Grimes MM, Sweeting J, Bertsch R, Cote LJ. Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology.* 1987 Jul; **37**(7): 1253-5
- Klos KJ, Ahlskog JE, Josephs KA, Apaydin H, Parisi JE, Boeve BF, *et al.* Alphasynuclein pathology in the spinal cords of neurologically asymptomatic aged individuals. *Neurology.* 2006; **66**(7): 1100-2.
- Keller JN, Huang FF, Dimayuga ER, Maragos WF. Dopamine induces proteasome inhibition in neural PC12 cell line. *Free Radical Biol Med* 2000; **29**: 1037– 1042.
- Kim S, Seo JH, Suh UH.  $\alpha$ -synuclein, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. *Park Relat Disord.* 2004; **10**: S9–S13.
- Krygowska-Wajs A, Loren K, Thor P, Szczudlik A, Konturek S. Gastric electromechanical dysfunction in Parkinson's disease. *Funct Neurol.* 2000; **15**: 41-46.
- Kühn, K., Wellen, J., Link, N., Maskri, L., Lübbert, H., Stichel, C.C. The mouse MPTP model: gene expression changes in dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2003; **17**, 1-12.
- Kaye J, Gage H, Kimber A, Storey L, Trend P. Excess burden of constipation in Parkinson's disease: a pilot study. *Mov Disord.* 2006; **21**: 1270-3.
- Langstone JW, Ballard PA JR. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6- tetrahydropyridine. *N. Engl J Med.* 1983; **309**: 310.
- Langston JW, Ballard PA Jr . Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med.* 1983; **309**: 310.
- Lai BC, Schulzer M, Marion S, Teschke K, Tsui JK. The prevalence of Parkinson's disease in British Columbia, Canada, estimated by using drug tracer methodology. *Parkinsonism Relat Disord.* 2003 Mar; **9**(4): 233-8
- Lemack GE, Dewey RB, Roehrborn CG, O'Suilleabhain PE, Zimmern PE. Questionnaire-based assessment of bladder dysfunction in patients with mild to moderate Parkinson's disease. *Urology.* 2000; **56**: 250–254.
- Lewitan A, Nathanson L, Slade WR. Megacolon and dilatation of the small bowel in parkinsonism. *Gastroenterology.* 1951; **17**: 367-374.
- Low, P., editor. Clinical Autonomic Disorders. 1. Boston: Little, Brown and Company; 1993.
- Low PA. Prevalence of orthostatic hypotension. *Clinical Autonomic Research.* 2008; **18**(Suppl. 1): 8-13.
- Longstreth WT Jr, Meschke JS, Davidson SK, Smoot LM, Smoot JC, Koepsell TD. Hypothesis: a motor neuron toxin produced by a clostridial species residing in gut causes ALS. *Med Hypotheses.* 2005; **64**: 1153–6.

- Lotharius J, Brundin P. Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2002 Oct 1; **11**(20): 2395-407.
- Li ZS, Pham TD, Tamir H, Chen JJ, Gershon MD. Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage and effects of extrinsic denervation. *J neurosci*. 2004; **24**: 1330-9.
- Liu M, Geddis MS, Wen Y, Setlik W, Gershon MD. Expression and function of 5-HT4 receptors in the mouse enteric nervous system. *Am j Physiol Gastrointes Liver Physiol*. 2005; **289**: 1148.
- Mari F, Matei M, Bartolini M, Montesi A, Ceravolo MG, Provinciali L. Poor predictive value of clinical measures of dysphagia versus aspiration risk in parkinsonian patients. *Mov Disord*. 1997; **12**: 135.
- Marinella MA. Acute colonic pseudo-obstruction complicated by cecal perforation in a patient with Parkinsonian disease. *South Med J*. 1997; **90**: 1023-1026.
- Mathers SE, Kempster PA, Law PJ, Frankel JP, Bartram CI, Lees AJ, Stern GM, Swash M. Anal sphincter dysfunction in Parkinson's disease. *Arch Neurol*. 1989 Oct; **46**(10): 1061-4
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988; **38**: 1285-1291.
- McNaught KSP, Jenner P, Olanow CW. Protein mishandling: Role of the ubiquitin proteasome system in the pathogenesis of Parkinson's disease. In: Jankovic J, Tolosa E, eds. *Parkinson's disease and movement disorders*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2007: 33-49.
- McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2001; **297**: 191-194.
- McCormack AL, Mak SK, Shenasa M, Langston WJ, Forno LS, Di Monte DA. Pathologic modifications of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated squirrel monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008 Aug; **67**(8): 793-802.
- Miller AJ. Neurophysiological basis of swallowing. *Dysphagia* 1986; **1**: 91-100.
- Melamed E, Zoldan J, Galili-Mosberg R, Ziv I, Djaldetti R. Current management of motor fluctuations in patients with advanced Parkinson's disease treated chronically with levodopa. *J Neural Trasm Suppl*. 1999; **56**: 173 -83.
- Minguez-Castellanos A, Chamorro CE, Escamilla-Sevilla F, Ortega-Morena A, Rebollo AC, Gomez-Rio M et al. Do alpha-synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders?: a cohort study . *Neurology*. 2007; **68**: 2012-8.
- Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 b, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-a levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1996; **211**: 13-16.
- Morgan JC, Sethi KD. Tegaserod in constipation associated with Parkinson disease. *Clin Neuroparmacol*. 2007; **30**: 52-4.
- Mouradian MM. Should levodopa be infused into the duodenum? *Neurology*. 2005; **64**: 182-3.

- Møller E, Karlsborg M, Bardow A, Lykkeaa J, Nissen FH, Bakke M. Treatment of severe drooling with botulinum toxin in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease: efficacy and possible mechanisms. *Acta Odontol Scand*. 2011 May; **69**(3): 151-7.
- Muller T, Kuhn W, Buttner T, Eising E, Coenen H, Haas M, Przuntek. Colour vision abnormalities do not correlate with dopaminergic nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *J Neurol*. 1998; **245**: 659-664.
- Müller J, Wenning GK, Verny M, McKee A, Chaudhuri KR, Jellinger K, et al. Progression of dysarthria and dysphagia in postmortem-confirmed parkinsonian disorders. *Arch Neurol*. 2001; **58**: 259-64.
- Mullins WM, Gross CW, Moore JM. Long-term follow-up of tympanic neurectomy for sialorrhea. *Laryngoscope* 1979; **89**: 1219-23.
- Natale G, Pasquali L, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. Parkinson's disease and the gut: a well known clinical association in need of an effective cure and explanation. *Neurogastroenterol Motil*. 2008; **20**: 741-9.
- Natale G, Kastsiushenka O, Fulceri F, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut. *Brain Res*. 2010 Oct 8; **1355**: 195-206.
- Nakai M, Fujita M, Waragai M, et al. Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; **358**: 104-110.
- Nakayama Y, Washio M, Mori M. Oral health conditions in patients with Parkinson's disease. *J Epidemiol* 2004; **14**: 143-50.
- Nóbrega AC, Rodrigues B, Torres AC, Scarpel RD, Neves CA, Melo A. Is drooling secondary to a swallowing disorder in patients with Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord* 2008; **14**: 243-5.
- Nirenberg MJ, Waters C. Compulsive eating and weight gain related to dopamine agonist use. *Mov Disord* 2006; **21**: 524-9.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6 tetrahydropyridine. *Life Sci*. 1985; **36**: 2503-2508.
- Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: Distribution of Lewy bodies and monoamine neuron system. *Acta Neuropathol*. 1976; **34**: 311-9.
- Olanow CW, Prusiner SB. Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 4; **106**(31): 12571-2.
- Orimo S, Takahashi A, Uchihara T, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H. Degeneration of cardiac sympathetic nerve begins in the early disease process of Parkinson's disease. *Brain Pathol*. 2007 Jan; **17**(1): 24-30.
- Ozdemir V, Jamal MM, Osapay K, Jadus MR, Sandor Z, Hashemzadeh M, Szabo S. Cosegregation of gastrointestinal ulcers and schizophrenia in a large national inpatient discharge database: revisiting the "brain-gut axis" hypothesis in ulcer pathogenesis. *J Investig Med*. 2007 Sep; **55**(6): 315-20
- Parkinson J. 1817. An essay on the shaking palsy. Whittingham and Rowland for Sherwood, Needly and Jones, London.
- Palmer ED. Dysphagia in parkinsonism, *JAMA*. 1974; **229**: 1349.
- Perez RG, Hastings TG. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem*. 2004 Jun; **89**(6): 1318-24



- Petrovitch H, Ross GW, Abbott RD, Sanderson WT, Sharp DS, Tanner CM, Masaki KH, Blanchette PL, Popper JS, Foley D, Launer L, White LR. Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. *Arch Neurol*. 2002 Nov; **59**(11): 1787-92.
- Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011 Jan; **17**(1): 10-5.
- Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2003; **2**: 107-16.
- Phillips RJ, Walter GC, Wilder SL, Baronwsky EA, Powley TL. Alfa-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: Autonomic pathway implicated in Parkinson's disease? *Neuroscience*. 2008; **153**: 733-50.
- Purisai MG, McCormack AL, Langston WJ, Johnston LC, Di Monte DA. Alpha-synuclein expression in the substantia nigra of MPTP-lesioned non-human primates. *Neurobiol Dis*. 2005 Dec; **20**(3): 898-906.
- Potulska A, Friedman A, Królicki L, Spychala A. Swallowing disorders in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2003; **9**: 349-53.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease [see comments]. *Science*. 1997; **276**: 2045–2047.
- Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology*. 1984; **87**: 848 – 56.
- Quigley EMM. Gastrointestinal features. in: Factor SA, Weiner WJ, eds. Parkinson's disease: diagnosis and clinical management. *New york: Demos*, 2002: 87-93.
- Rosenthal MJ, Marshall CE. Sigmoid volvulus in association with parkinsonism. Report of four cases. *J Am Geriatr Soc*. 1987; **35**: 683-684.
- Rajput AH. Frequency and cause of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*. 1992; Feb; **19**(1 Suppl): 103-7.
- Ruffoli R, Soldani P, Pasquali L, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. Methamphetamine fails to alter the noradrenergic integrity of the heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; **1139**: 337-44.
- Richer P, Meige H. Etude morphologique sur la maladie de Parkinson. *Nouvelle Iconographie de la Salpetriere*. 1895; **8**: 361–371.
- Sakakibara R, Shinotoh H, Uchiyama T, Yoshiyama M, Hattori T, Yamanishi T. SPECT imaging of the dopamine transporter with [(123)I]-b-CIT reveals marked decline of nigrostriatal dopaminergic function in Parkinson's disease with urinary dysfunction. *J Neurol Sci*. 2001; **187**: 55–59.
- Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, et al. Accumulation of phosphorylated a-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003; **62**: 644–654.
- Scott B, Borgman A, Engler H, Johns B, Aquilonius SM. Gender differences in Parkinson's disease symptom profile. *Acta neurol Scand*. 2000; **102**: 37-43.
- Schwarz J, Heimhilger E, Storch A. Increased periodontal pathology in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2006; **253**: 608-11.
- Schuler F, Casida JE. The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Manag Sci*. 2001; Oct; **57**(10): 932-40.

- Sartucci F, Orlandi G, Lucetti C, Bonuccelli U, Murri L, Orsini C, Porciatti V. Changes in pattern electroretinograms to equiluminant red-green and blue-yellow gratings in patients equiluminant red-green and blue-yellow gratings in patients with early Parkinson's disease. *J Clin Neurophysiol*. 2003; **20**: 375–381.
- Sharabi Y, Li ST, Dendi R, Holmes C, Goldstein DS. Neurotransmitter specificity of sympathetic denervation in Parkinson's disease. *Neurology*. 2003; **60**: 1036–1039.
- Schestatsky P, Ehlers JA, Rieder CR, Gomes I. Evaluation of sympathetic skin response in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2006; **12**: 486–491.
- Scott B, Borgman A, Engler H, Johnels B, Aquilonius SM. Gender differences in Parkinson's disease symptom profile. *Acta Neurol Scand*. 2000 Jul; **102**(1): 37–43.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies [letter]. *Nature*. 1997; **388**: 839–840.
- Srivastava T, Ahuja M, Srivastava M, Trivedi A. Bruxism as a presentino feature of Parkinson's disease. *J Assoc Physicians India*. 2002; **50**: 457.
- Shi XZ, Choudhuri BK, Pasricha PJ, Sarna SK. A novel role of VIP in colonic motility function: induction of excitation-transcription coupling in smooth muscle cells. *Gastroenterology*. 2007; **132**: 1388–400.
- Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. Pesticides and Parkinson's disease. *Scientific World Journal*. 2001 May 1; **1**: 207–8.
- Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2003 May 1; **341**(2): 87–90.
- Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci*. 2002; **22**: 7006–7015.
- Shimada J, Sakakibara R, Uchiyama T, Liu Z, Yamamoto T, Ito T et al. Intestinal pseudo-obstruction and neuroleptic malignant syndrome in a chronically constipated parkinsonian patient. *Eur J Neurol* 2006; **13**: 306–307.
- Singer C. Urinary dysfunction in Parkinson's disease. *Clin Neurosci* 1998; **5**: 78–86.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1994Sep; **36**(3): 356–61.
- Singaram C, Ashraf W, Gaumnitz EA et al. Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet* 1995; **346**: 861–864.
- Siddiqui MF, Rast S, Lynn MJ, Auchus AP, Pfeiffer RF. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease: a comprehensive symptom survey. *Parkinsonism Relat Disord*. 2002; **8**: 277–84.
- Soykan I, Lin Z, Bennett JP, McCallum RW. Gastric myoelectrical activity in patients with Parkinson's disease: evidence of a primary gastric abnormality. *Dig Dis Sci*. 1999; **44**: 927–31.
- Staal RG, Sonsalla PK. Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; **293**: 336–42.
- Sugie M, Goto J, Kawamura M, Ota H. Increased norepinephrine- associated adrenomedullary inclusions in Parkinson's disease. *Pathol Int*. 2005; **55**: 130–136.

- Szabo S, Brown A, Pihan G, Dali H, Neumeyer JL. Duodenal ulcer induced by MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). *Proc Soc Exp Biol Med.* 1985; **180**: 567-571.
- Szabo S. MPTP, gastroduodenal motility, duodenal ulceration, and Parkinson's disease. *Dig Dis Sci.* 1990; **35**: 666-7.
- Talpade DJ, Greene JG, Higgins DS Jr, Greenamyre JT. In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H] dihydrorotenone. *J Neurochem.* 2000 Dec; **75**(6): 2611-21.
- Tateno F, Sakakibara R, Yokoi Y, Kishi M, Ogawa E, Uchiyama T, Yamamoto T, Yamanishi T, Takahashi O. Levodopa ameliorated anorectal constipation in de novo Parkinson's disease: The QL-GAT study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011 Nov; **17**(9): 662-6.
- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y-A novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic peptide. *Nature.* 1982; **296**: 659-60.
- Thomsen TR, Galpern WR, Asante A, Arenovich T, Fox SH. Ipratropium bromide spray as treatment for sialorrhea in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2007; **22**: 2268-73.
- Truong DD, Jost WH. Botulinum toxin: clinical use. *Parkinsonism Relat Disord.* 2006; **12**: 331-55.
- Trètiakoff C. Contribution à l'étude de l'anatomie du locus niger. *Rev Neurol.* 1921; **37**: 592-608.
- Trugman JM, Quinn CC, Shaffer HA. Esophageal disorders and surgery. In: Biller J, editor. The interface of neurology & internal medicine. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins.* 2008. p. 217-21.
- Tuite PJ, Maxwell RE, Ikramuddin S, Kotz CM, Billington CJ, Laseski MA, et al. Weight and body mass index in Parkinson's disease patients after deep brain stimulation surgery. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005; **11**: 247-52.
- Ueki A, Otsuka M. Life style risks of Parkinson's disease: association between decreased water intake and constipation. *J Neurol.* 2004; **251**: vII18-23.
- Vaughan CJ, Aherne AM, Lane E, Power O, Carey RM, O'Connell DP. Identification and regional distribution of the dopamine D(1A) receptor in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; **279**: 599-609.
- Verbaan D, Marinus J, Visser M, van Rooden SM, Stiggelbout AM, van Hilten JJ. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease. *Neurology.* 2007; **69**: 333-341.
- von Economo C. Grippe-encephalitis und Encephalitis lethargic. *Wiener klinische Wochenschrift.* 1919; **32**: 393-396.
- Wald A. Anorectal and pelvic floor dysfunction. In: Quigley EMM, Pfeiffer RF, editors. *Neuro-gastroenterology.* Philadelphia: *Butterworth Heinemann.* 2004. p. 255-71.
- Walters G, Ramesh P, Memon MI. Buried Bumper Syndrome complicated by intra-abdominal sepsis. *Age Ageing.* 2005 Nov; **34**(6):650-1.
- Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. The presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol.* 1988; **76**: 217-221.
- Waters C. Other pharmacological treatments for motor complications and dyskinesias. *Mov Disord.* 2005; **20** Suppl 11: S38-44.



- Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol.* 1990; **79**: 581-3.
- Wolters ECh. Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009 Dec; **15** Suppl 3: S6-12
- Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Takeda S, Ikuta F. Lewy bodies in the visceral autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 1993; **60**: 609-12.
- Wakabayashi K, Toyoshima Y, Awamori K, Anezaki T, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. Restricted occurrence of Lewy bodies in the dorsal vagal nucleus in a patient with late-onset parkinsonism. *J Neurol Sci.* 1999; **165**: 188-91.
- Wedel T, Roblick U, Gleiss J, Schiedeck T, Bruch HP, Kühnel W, Krammer HJ. Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann Anat.* 1999; **181**: 327-37.
- Wintzen AR, Badrising UA, Roos RA, Vielvoye J, Liauw L, Pauwels EK. Dysphagia in ambulant patients with Parkinson's disease: common, not dangerous. *Can J Neurol Sci* 1994; **21**: 53-56.
- Winge K, Skau AM, Stimpel H, Nielsen KK, Werdelin L. Prevalence of bladder dysfunction in Parkinson's disease. *Neurourol Urodyn* 2006; **25**: 116-122.
- Williams DR, Watt HC, Lees AJ. Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006; **77**: 468-73.
- Williams RBH, Wallace KL, Ali GN, Cook IJ. Biomechanics of failed deglutitive upper esophageal sphincter relaxation in neurogenic dysphagia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283: G16-26.
- Zhang ZX, Dong ZH, Román GC. Early descriptions of Parkinson disease in ancient China. *Arch Neurol.* 2006 May; **63**(5): 782-4.
- Zesiewicz TA, Sullivan KL, Arnulf I, Chaudhuri KR, Morgan JC, Gronseth GS, et al. Practice Parameter: treatment of non motor symptoms of Parkinson disease: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2010; **74**(11): 924-31.

## RINGRAZIAMENTI

*Desidero ringraziare il Prof. Antonio Paparelli per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso di Dottorato.*

*Desidero ringraziare il Prof. Natale, relatore di questa tesi, per la grande disponibilità e cortesia dimostratami, e per tutto l'aiuto fornito durante la stesura.*

*Inoltre vorrei ringraziare il Prof. Fornai, le Ricercatrici: Paola, Michela, Federica, Gloria e Ilaria e i colleghi Luca, Leonardo, Alessia S. Alessia B. Mariangela e Silvio, Marina per il loro contributo umano e professionale  
e alla mia famiglia*